

Aus der Universitäts-Frauenklinik
Direktor: Prof. Dr. med. R. Dyroff

**Über die eiweißspaltenden Fermente
der weiblichen Genitalorgane
unter besonderer Berücksichtigung
des Endometriums**

Habilitationsschrift

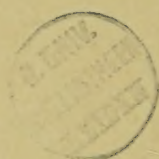
Vorgelegt der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Alexander-Universität zu Erlangen

von

Dr. med. Karl Fuhrmann

Erlangen 1958



Aus der Universitäts-Frauenklinik Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. R. DYROFF)

Über die Exopeptidasen des Endometriums*

Von

KARL FUHRMANN**

Mit 23 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. Oktober 1958)

Einleitung

Die Proteasen sind bekanntlich Enzyme, die fähig sind, Peptidbindungen zu spalten. Entsprechend ihrer überragenden Bedeutung ist das Vorkommen im Organismus ubiquitär. Extracellulär dienen sie zum Aufschluß der Nahrungsproteine; intracellulär wird ihnen außer dem Abbau auch eine Funktion beim Umbau und Aufbau der Eiweißstoffe zugeschrieben. Nach dem Tode tritt die Wirkung der eiweißspaltenden Fermente als Autolyse in Erscheinung.

Die eiweißspaltenden Fermente wurden früher im allgemeinen in 2 Gruppen eingeteilt, in die *Proteinasen* und in die *Peptidasen*. Da sich in den letzten Jahren gezeigt hat, daß alle gut charakterisierten Proteinasen auch synthetische Peptide und ihre Derivate spalten können, unterscheidet man heute nach BERGMANN⁷ zwischen den *Endopeptidasen* und zwischen den *Exopeptidasen*. Die Exopeptidasen wirken auf einfache Verbindungen, die eine oder mehrere freie terminale polare Gruppen besitzen, wie eine α -Amino- oder α -Carboxylgruppe oder beide. Im Gegensatz dazu können Endopeptidasen Verbindungen hydrolysieren, welche keine freien terminalen Amino- oder Carboxylgruppen besitzen, oder die polare Gruppen an anderer Stelle als in α -Stellung zur Peptidbindung enthalten. Die Endopeptidasen sind fähig, auf die zentrale Peptidbindung von Eiweißen oder auf substituierte Peptide der entsprechenden Konfiguration einzuwirken. Auf das ausführliche Übersichtsreferat von SMITH in SUMNER-MYRBÄCK⁷⁹, 1951, wird verwiesen.

Über die proteolytischen Fermente der *Genitalorgane* wissen wir insgesamt nur sehr wenig. Wohl liegen eine Reihe von Arbeiten vor, diese sind aber vorwiegend älteren Datums und dem damaligen Wissensstand entsprechend mit Methoden durchgeführt worden, die einer exakten

* Herrn Prof. DYROFF zum 65. Geburtstag gewidmet.

** Es ist mir eine angenehme Pflicht, dem Chemiker der Klinik, Herrn Dr. rer. nat. R. DITTMAYER, für die Ratschläge bei der Durchführung der Arbeit und dem Physiker der Klinik, Herrn Dr. phil. A. REUSS, für die Mithilfe bei der statistischen Berechnung zu danken.

Beurteilung der Ergebnisse auf Grund neuerer Erkenntnisse nicht mehr ohne weiteres standhalten.

So beruhen unsere heutigen Vorstellungen über die proteolytische Fermenttätigkeit des *Endometriums* im wesentlichen noch auf den Arbeiten von GRAEFENBERG¹⁹ (1910), HALBAN und FRANKL²⁵ (1910), FRANKL und ASCHNER¹⁵ (1911) und CAFFIER¹⁰ (1930). Hierbei wurde die Fermentaktivität des Endometriums mit groben Schätzungsmethoden entweder nach der Menge der aus einer Seidenpeptonlösung enzymatisch abgespalteten Tyrosinkristalle¹⁵ oder nach der Tiefe der auf einer Serumplatte gebildeten Delle^{10, 19, 25} beurteilt. Nach diesen Untersuchungen soll in der prämenstruellen Gebärmutter Schleimhaut ein trypsinähnliches Ferment vorkommen, das für den „tryptischen“ Abbau des Endometriums verantwortlich gemacht wird, wobei auch noch der Gehalt des Endometriums an „Antitrypsin“ eine Rolle spielen soll. Nach Ansicht der Untersucher wird das proteolytische Enzym von den Schleimhautdrüsen vor der Menstruation sezerniert. Es ist erstaunlich, daß diese Beobachtungen mit ihren weitgehenden und in fast alle Lehrbücher eingegangenen Schlußfolgerungen vor der Klassifizierung der eiweißspaltenden Fermente kaum nachgeprüft wurden. Über die Exopeptidasen des Endometriums ist außer der Feststellung von NAKAHORI⁵², daß im Endometrium eine „Ereptase“ vorkommt, nichts bekannt. Vergleichende Untersuchungen über die Exopeptidaseaktivität des Endometriums während der verschiedenen Cyclusphasen fehlen ganz. In neuerer Zeit wurde die Endopeptidaseaktivität (Kathepsinkomplex) während des Cyclus von STARK und VORHERR⁸⁵ untersucht.

Ebenso gering sind unsere Kenntnisse über die eiweißspaltenden Fermente der Uterusmuskulatur, an deren Vorkommen von CAFFIER¹⁰ gezweifelt wurde. Nur Exopeptidasen wurden bisher von SMITH^{73, 74} und ROCHE⁶³ mit Sicherheit nachgewiesen. Ein Vergleich der Fermentaktivität des Endometriums mit der des Myometriums liegt noch nicht vor.

Über das Vorkommen von proteolytischen Fermenten im *Eierstock* sind die Angaben sehr verschieden. Während GRAEFENBERG¹⁹, CAFFIER¹⁰ kein „Trypsin“ und LOEB⁴³ kein „Erepsin“ fanden, soll nach ERPF-LEFKOVICS und ROSENBLUM¹³ in der Schwangerschaft eine alkalische Protease von stärkerer Aktivität auftreten. Nach TACHIBANA⁸⁴ kommen in Eierstockcysten proteolytische Fermente vom Typ des Trypsins und Pepsins vor, auch PETRY^{58, 59} konnte in der Follikelflüssigkeit Proteasen nachweisen. JUNG³⁵ stellte im Follikelinhalt Kathepsin fest. ROEMER⁶⁴ wies eine Ovoproteinase nach. Untersuchungen über die eiweißspaltenden Fermente im *Corpus luteum* sind uns nicht bekannt.

Von allen weiblichen Genitalorganen ist wohl die *Placenta* am meisten in bezug auf eiweißspaltende Fermente untersucht worden. Das ist bei

der großen Bedeutung der Placenta für den Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind verständlich. Es geht aus den vorliegenden Arbeiten hervor, daß in der Placenta sowohl Exopeptidasen als auch Endopeptidasen vorkommen, die sowohl im sauren, als auch im alkalischen Milieu wirksam sind. Vergleichende Untersuchungen über die Fermentaktivität in den verschiedenen Schwangerschaftsmonaten^{10, 19, 59a, 82} hatten sehr verschiedene Ergebnisse, die wohl in erster Linie der Methodik zuzuschreiben sind.

Die Übersicht über die eiweißspaltenden Fermente zeigt, wieviel Fragen noch ungeklärt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Exopeptidasen des Endometriums behandelt. Es ist bekannt, daß im Endometrium, dem Ort der Placentation, hormongesteuerte Stoffwechselvorgänge ablaufen, die eine wesentliche Bedeutung für die Eieinbettung haben. Tritt keine Befruchtung ein, wird die Gebärmutter Schleimhaut abgestoßen und schnell wieder von der verbliebenen Basalis aufgebaut. Dabei erfolgt ein ständiger Auf- und Abbau von Zelleiweiß, der eine rege Fermentaktivität erfordert. Das schnelle Wachstum unter Follikelhormoneinfluß in der Proliferationsphase deutet auf eine gesteigerte Eiweißsynthese hin, während wohl bei der Abstoßung der Schleimhaut zur Zeit der Menstruation infolge Absinkens des Follikel- und Corpus luteum-Hormonspiegels proteolytische Fermente eine Rolle spielen.

Um einen weiteren Einblick in die Eiweißstoffwechselvorgänge am Endometrium zu erhalten, wurden unter Anwendung neuerer analytischer Methoden *zunächst Aktivitätsbestimmungen von Exopeptidasen am Endometrium durchgeführt*. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche der gut charakterisierten Exopeptidasen kommen im Endometrium vor?
2. Bestehen cyclische Schwankungen der Exopeptidaseaktivität und steigt insbesondere die Aktivität vor dem menstruellen Schleimhautabbau an? Wie ist die Fermentaktivität in der Decidua?
3. Ändert sich bei pathologischen Zustandsbildern die Fermentaktivität des Endometriums?

Arbeitsmethodik

Durchführung der Versuche. — Methodisches zur Auswertung und Darstellung der Versuchsergebnisse.

a) Gewebezubereitung

Zu den Fermentaktivitätsbestimmungen am Endometrium stand uns jeweils nur eine geringe Menge Frischgewebe zur Verfügung, so daß sich eine teilweise Reinigung der Fermente, insbesondere die Herstellung von Acetontrockenpulver

nicht durchführen ließ. Da außerdem hierbei unkontrollierbare Verluste der Exopeptidase-Aktivität auftreten⁷³, mußten wir uns für unsere Vergleichsuntersuchungen am Endometrium auf Arbeiten mit ungereinigten Enzymlösungen beschränken. Das Gewebe wurde unmittelbar nach der Operation entnommen. Ein Teil des Gewebes diente zur histologischen Untersuchung. Ein anderer Teil des Gewebes wurde gewogen und anschließend unter Zugabe einer bestimmten Menge H_2O (1 Gew.-Teil + 9 Teile H_2O) unter Kühlung in einem Glashomogenisator (nach POTTER und ELVEHJEM⁶⁰ zerkleinert. Nach 3 min Homogenisierung (1200 U/min) ergab die mikroskopische Untersuchung nur noch Zelltrümmer. Das 10%ige Homogenat wurde bei 5° im Eisschrank bis zur Untersuchung aufbewahrt. Die Untersuchungen wurden in der Regel 6–8 Std nach der Materialgewinnung durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt hat, wie Enzymstabilitätsuntersuchungen an verschiedenen Substraten ergaben, noch keine nennenswerte Fermentinaktivierung eingesetzt.

Zu den Untersuchungen wurden nur Endometrien verwandt, die makro- und mikroskopisch keine krankhaften Veränderungen aufwiesen. Die Festlegung des Cyclustages erfolgte auf Grund klinischer Beobachtung oder nach den anamnestischen Angaben der Patientin (Regelkalender).

b) Stickstoffbestimmung

Um eine Bezugsbasis für vergleichende Untersuchungen zu haben, wurde von jedem Homogenat der Gesamtstickstoffgehalt nach KJELDAHL bestimmt. Die ermittelten Stickstoffwerte wurden berechnet in Milligramm Gesamtstickstoff pro Milliliter Enzymlösung.

c) Bestimmung der Exopeptidaseaktivität mit der Mikrotitration nach GRASSMANN und HEYDE²¹

Standardansatz

Das Volumen des Standardansatzes zur Bestimmung der Peptidhydrolyse betrug in der Regel 2,0 ml: 1,0 ml Enzymlösung + 1,0 ml Substratlösung. Dazu kamen bei Aktivierungsversuchen 0,02 ml Aktivator und bei länger dauernden Versuchen 0,02 ml Toluol. Sowohl die Enzym- als auch die Substratlösung wurden mit einem Puffer versetzt: Veronalpuffer pH 8,0 (0,05 M) nach MICHAELIS, Phosphatpuffer pH 7,2 (0,15 M) nach SØRENSEN oder Acetatpuffer pH 4,6 (0,04 M). Die Inkubation erfolgte bei 37° C im Wasserbad.

Die Enzymlösungen wurden je nach der Spaltbarkeit der Substrate in einer Konzentration von 1,0 oder 0,1% verwandt. Abweichungen von diesen Konzentrationen sind besonders angegeben. Die Fermentkonzentration entsprach einer Menge von 0,010 g oder 0,001 g Frischgewebe je Millimeter Homogenat.

Die Substratkonzentration betrug in der Regel 0,05 M im Ansatz, da diese Konzentration sich nach den Untersuchungen von SMITH⁷³ als sehr geeignet erwiesen hat.

Bestimmung der Hydrolyse

Die Methode beruht auf der Titration der bei der Peptidhydrolyse frei werdenden Carboxylgruppen mit n/100 alkoholischer Kalilauge. Durch den Alkoholzusatz wird die Mitbestimmung der Aminogruppen ausgeschaltet. Als Indicator dient eine 0,1%ige alkoholische Thymolphthaleinlösung.

Aus dem Fermentansatz wurden 0,2 ml mit 3 Tropfen alkoholischer 0,1%igen Thymolphthaleinlösung versetzt und n/100 alkoholischer KOH bis zur deutlichen

Blaufärbung zugegeben. Nach Zugabe von 1,8 ml absolutem Äthanol erfolgte die Titration mit n/100 alkoholischer KOH bei künstlichem Licht bis zum Endpunkt. Als Farbstandard diente eine 1/400 molare, ammoniakalische Kupferchloridlösung, der zur Trübung etwas Talkum zugesetzt wurde.

Vor Ermittlung der Fermentaktivität erfolgte die Bestimmung des Leerwertes aus dem nicht-inkubierten Fermentansatz. Der Mittelwert aus 3 Bestimmungen ergab nach Abzug des Leerwertes den Wert für die Hydrolyse des Peptids.

Endometriumautolyse und nicht-enzymatische Substrathydrolyse

Grundsätzlich wurde vor jeder Versuchsreihe ermittelt, ob eine nicht-enzymatische Hydrolyse der Substrate unter den gewählten Versuchsbedingungen stattfindet. Bei diesen Versuchen zeigte sich, daß eine solche Hydrolyse auch nach langer Inkubationszeit bei 37° C nicht stattfindet. Ebenso ist bei 5° C (Eisschranktemperatur) auch nach Wochen keine Aciditätszunahme zu ermitteln. Eine Autolyse des Endometriums ist bei den verwendeten Homogenatkonzentrationen sehr gering (s. Tabelle 1); erst nach langer Inkubation machte sie sich bemerkbar. Da die Versuche im allgemeinen in kurzer Zeit durchgeführt wurden, darf die Homogenatautolyse unberücksichtigt bleiben.

Tabelle 1. *Endometriumautolyse. Standardansatz, Mikrotitration nach GRASSMANN und HEYDE*

A Vers.- Nr.	B Prot.- Nr.	C Ges.-N	D I-Zeit Std	E ml n/100 KOH	F Puffer oder andere Zusätze
1	75/57	0,130	13	0,00	H ₂ O
2	75/57	0,013	60	0,02	Acetatpuffer 0,04 M p _H 4,6
3	723/57	0,186	24	0,00	Acetatpuffer 0,04 M p _H 4,6
4	723/57	0,186	24	0,03	Veronalpuffer 0,05 M p _H 8,0
5	541/57	0,143	24	0,05	Phosphatpuffer 0,15 M p _H 7,2

A = Nr. des Versuches; B = Protokoll-Nr.; C = Gesamt-N in mg/ml Homogenat; D = Inkubationszeit in Stunden, 37°; E = Mehrverbrauch in Milliliter alkoholischer n/100 KOH gegenüber dem Leerwert (Standardansatz, Mikrotitration nach GRASSMANN und HEYDE).

Fehlerberechnung der Mikrotitration nach GRASSMANN und HEYDE

Zur Prüfung der Zuverlässigkeit der Methode zur Hydrolysebestimmung der Peptide in verschiedenen Ansätzen wurden vom gleichen Endometrium je 10 verschiedene Spaltungsansätze hergestellt und bei 45 min inkubiert. Dabei wurden folgende Werte erhalten, ausgedrückt in Prozent Spaltung: 17, 17, 18, 15, 15, 16, 17, 16, 16, 16. Der Mittelwert und die Streuung wurden nach folgender Formel berechnet (KOLLER):

$$M = \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = \frac{163}{10} = 16,3$$

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} = 0,90 \quad s = \pm 0,95$$

Der Variationskoeffizient betrug $s/\bar{x} = \pm 6\%$, d. h. bei dieser Mehrfachbestimmung war der Mittelwert $16,3\% \pm 0,95\%$ und die prozentuale Schwankungsbreite, auf den Mittelwert bezogen, betrug $\pm 6\%$.

d) Grundsätzliches über die Auswertung von Fermentversuchen

Die Aktivität eines Enzyms wird durch die Größe des chemischen Umsatzes, den es unter bestimmten Bedingungen katalysiert, definiert und gemessen. Nur ganz wenige Enzyme sind gegenwärtig in reiner Form isoliert. In den meisten Fällen ist nur die Wirkung (Aktivität) eines Enzyms, die in der chemischen Umwandlung des Substrates besteht, der Messung zugänglich. Je schneller die Umwandlung sich vollzieht, desto aktiver ist das Enzym. Grundlegend für die Bestimmung der Enzymmenge muß also die Erfassung der Reaktionsgeschwindigkeit der betreffenden Reaktion sein. Im einfachsten Fall ist die Zeit-Umsatzkurve eine Gerade, d.h. die Spaltung ist proportional der Zeit. In diesem Falle wird die Reaktion als 0. Ordnung bezeichnet, die Reaktionsgeschwindigkeit ist konstant, gleich der Steigung der Geraden und wird mit K_0 bezeichnet. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante 0. Ordnung ist durch die Formel

$$K_0 = \frac{1}{t} \cdot \frac{a}{a_0}$$

gegeben, wobei a_0 die Ausgangsmenge und a die zur Zeit t gespaltene Menge ist.

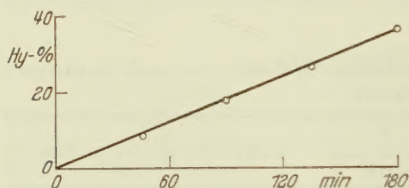


Abb. 1. Zeitlicher Verlauf der L-Leucylglycylglycin-Hydrolyse (Endometrium 75/57). Ordinate: Gespaltene Menge des LGG in Prozent der Ausgangsmenge. Abszisse: Zeit in Minuten. Substratkonzentration 0,05 M. Gewebshomogenat 1% = 0,010 g Frischgewebe je ml Enzymlösung. 0,15 M Phosphatpuffer (nach SØRENSEN), pH 7,2.

Inkubation bei 37°

Als Beispiel dient die Spaltung des L-Leucylglycylglycins durch Endometriumhomogenat (Abb. 1) bei der die Reaktionsgeschwindigkeit in der untersuchten Zeit konstant bleibt.

In den meisten Fällen variiert die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Zeit, sie ist anfangs meistens größer, um dann stetig gegen Null abzunehmen. Vielfach verläuft die Reaktion dabei exponentiell, d.h. sie ist von der Zahl der in jedem Zeitpunkt noch unveränderten Moleküle abhängig und wird als Reaktion 1. Ordnung (monomolekulare Reaktion) bezeichnet. Trägt man in solchen

Fällen den Logarithmus der gespaltenen (oder ungespaltenen) Menge gegenüber der Zeit auf, erhält man eine Gerade. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante 1. Ordnung kann nach SMITH⁷⁹ in Dezimal-Logarithmen nach der Formel

$$K_1 = \frac{1}{t} \log \left(\frac{a_0}{a_0 - a} \right)$$

berechnet werden, wobei a_0 die Ausgangsmenge gleich 100 gesetzt ist und a die gespaltene Menge zur Zeit t darstellt.

Als Beispiel dient die Glycyl-l-leucinspaltung durch Endometriumhomogenat (Abb. 2a und b). In Abb. 2a ist die ungespaltene Menge des GL in dekadischem Maßstab aufgetragen; man erhält gekrümmte Kurven. In Abb. 2b ist die ungespaltene Menge des GL halblogarithmisch aufgetragen. Es ergeben sich praktisch Geraden. Man findet aber auch Enzymreaktionen, bei denen die Reaktionsgeschwindigkeit schneller absinkt, als dies dem Verlaufe einer 1. Ordnung entspricht (Reaktion höherer Ordnung). Gewöhnlich folgt die Reaktion eine bestimmte Zeit lang einer dieser Ordnungen, um dann wieder davon abzuweichen. Daraus ergibt sich, daß als Maß der Aktivität die Reaktionsgeschwindigkeit während eines festgelegten Zeitabschnittes gewählt werden muß. In der Arbeit wurden zur Aktivitätsbestimmung der Enzyme in der Regel 2 Meßpunkte in einen Bereich gelegt,

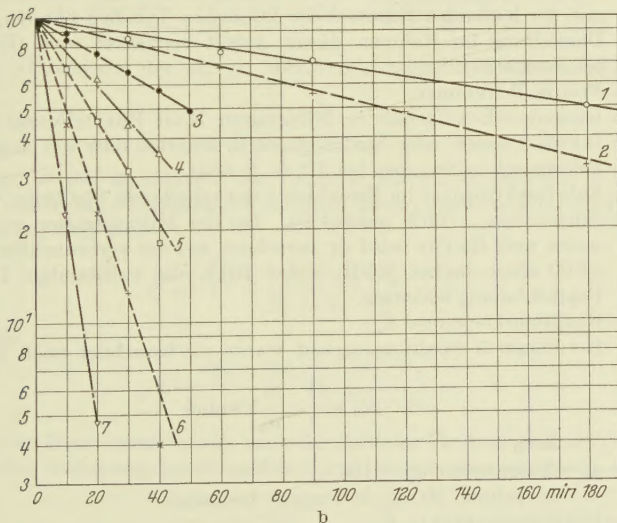
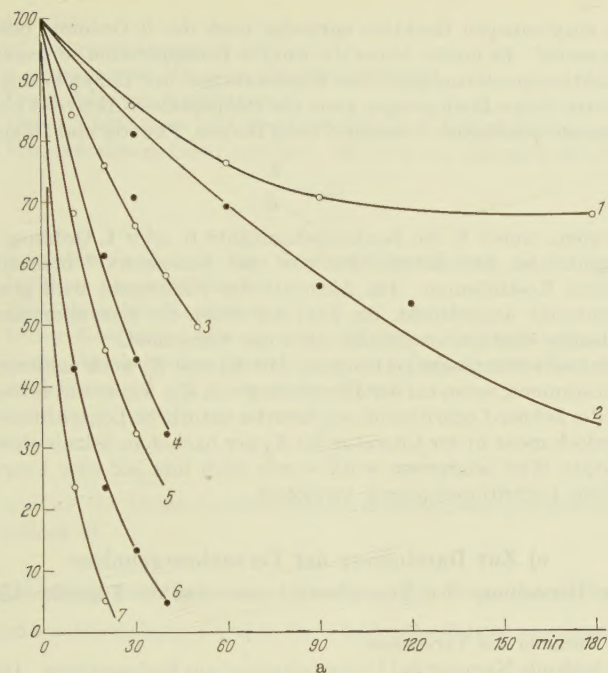


Abb. 2a u. b. a Zeitlicher Verlauf der Glycyl-l-leucin-Hydrolyse, in dekadischem Maßstab aufgetragen. Nummer der Kurven s. Tabelle 3. Ordinate: Ungesplante Menge des Glycyl-l-leucin in Prozent der Ausgangsmenge (Hy-%). Abszisse: Zeit in Minuten. Substratkonzentration konstant, 0,05 M. Enzymkonzentration variiert (s. Tabelle 3). 0,15 M Phosphatpuffer (nach SØRENSEN) pH 7,2. Inkubation 37°. b Zeitlicher Verlauf der Glycyl-l-leucin-Hydrolyse durch Endometriumhomogenat. Halblogarithmische Darstellung. Ordinate: Ungesplante Menge des Glycyl-l-leucin in Prozent der Ausgangsmenge (Hy-%). Abszisse: Zeit in Minuten

in dem die enzymatische Reaktion entweder nach der 0. Ordnung oder nach der 1. Ordnung verlief. Es mußte ferner die Enzym-Konzentration so gewählt werden, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Konzentration der Enzymlösung proportional war. Unter diesen Bedingungen kann die Exopeptidase-Aktivität einer Enzymlösung gegen ein spezifisches Substrat S nach IRVING, FRUTON und BERGMANN³³ als

$$C_s = \frac{K}{E}$$

definiert werden, wobei K die Reaktionskonstante 0. oder 1. Ordnung und E die Enzymkonzentration ist. IRVING, FRUTON und BERGMANN³³ bezeichnen C_s als proteolytischen Koeffizienten. Die Aktivität des Kathepsins wird gewöhnlich in Kathepsineinheiten ausgedrückt, die Zahl der durch die Enzymkonzentration geteilten Einheiten wird als spezifische Aktivität bezeichnet.

Es ist darauf aufmerksam zu machen, daß K_0 und K_1 auch zahlenmäßig praktisch übereinstimmen, wenn bei der Berechnung von K_1 , wie es theoretisch richtiger wäre, nicht der Zehner-Logarithmus, sondern der natürliche Logarithmus verwendet wird. Da jedoch meist in der Literatur für K_1 der nach dem dekadischen Logarithmus berechnete Wert angegeben wird, wurde auch hier auf eine Umrechnung in das natürliche Logarithmensystem verzichtet.

e) Zur Darstellung der Versuchsergebnisse

Bei der Darstellung der Versuchsergebnisse werden folgende Abkürzungen benutzt:

Vers.-Nr. = Nummer des Versuches.

Lfd. Nr. = laufende Nummer bei Untersuchungen am Endometrium. Diese stimmt mit der laufenden Nummer der klinischen Tabellen überein, auf deren Darstellung im Rahmen dieser Arbeit verzichtet wird (Einzelheiten bei FUHRMANN¹⁷).

Prot.-Nr. = Protokoll-Nummer.

Ges.-N = Gesamtstickstoffgehalt in Milligramm N/ml Enzymlösung (s. S. 664).

I-Zeit = Inkubationszeit oder Spaltungszeit in Minuten oder bei längerer Inkubationszeit in Stunden bei 37° (s. S. 664).

Hy-% = Substrathydrolyse im Prozentsatz der erhaltenen Spaltung, wobei Ausgangsmenge = 100% gesetzt ist. Bei der Mikrotitration nach GRASSMANN und HEYDE wird er berechnet aus der verbrauchten Menge an n/100 alkoholischer KOH, wobei 100% die vollständige Lösung der Peptidbindung bedeuten.

K_0 = Reaktionskonstante K_0 .

Bei linearem Spaltungsverlauf wurde sie berechnet nach der Formel

$$K_0 = \frac{1}{t} \cdot \frac{a}{a_0} \text{ wobei}$$

t = Zeit,

a_0 = Ausgangsmenge = 100%,

a = gespaltene Menge in Prozent bedeuten.

K_1 = Reaktionskonstante K_1 .

Bei nicht linearem Spaltungsverlauf, d.h. wenn die Fermentreaktion annähernd wie eine Reaktion 1. Ordnung verlief, wurde die Reaktionskonstante nach folgender Formel in dekadischen Logarithmen berechnet

$$K_1 = \frac{1}{t} \log \left(\frac{a_0}{a_0 - a} \right) \text{ wobei}$$

t = Zeit,

a_0 = Ausgangsmenge = 100%,

a = gespaltene Menge in Prozent bedeuten.

C_0 = Proteolytischer Koeffizient C_0 .

Dieser Koeffizient gibt die Aktivität einer Enzymlösung an, wenn die Enzymreaktion linear verläuft. Es wird aus K_0 nach der Formel

$$C_0 = \frac{K_0}{N}$$

gerechnet, wobei N der Gesamtstickstoffgehalt in Milligramm pro Milliliter Enzymlösung ist.

C_1 = Proteolytischer Koeffizient C_1 .

Dieser Koeffizient gibt die Aktivität einer Enzymlösung an, wenn die Fermentreaktion annähernd wie eine 1. Ordnungsreaktion verläuft. Es wird berechnet aus K_1 nach der Formel

$$C_1 = \frac{K_1}{N}$$

wobei N der Gesamtstickstoffgehalt in Milligramm pro Milliliter Enzymlösung ist.

f) Statistisches Verfahren zur Sicherung der Versuchsergebnisse

Die Standard-Abweichung s wurde nach folgender Formel errechnet:

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \cdot \left\{ \sum (xi - \bar{x})^2 - \left[\frac{\sum (xi - \bar{x})}{n} \right]^2 \right\}$$

die mittlere Abweichung der wahren Mittelwerte beim Stichprobenumfang n nach

$$s_x = \frac{s}{\sqrt{n}}.$$

Zur Prüfung, ob die Mittelwerte der Gruppen statistisch gesichert voneinander abweichen, wurde das t -Verfahren^{66a} benutzt. Dabei wurde aus der quadratischen Abweichung der Differenz

$$s_d^2 = \frac{s_1^2(N_1 - 1) + s_2^2(N_2 - 1)}{N_1 + N_2 - 2}$$

die Prüfgröße

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s_d} \cdot \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}}$$

gebildet und an Hand einer Tabelle nach der Zahl der Freiheitsgrade ($N_1 + N_2 - 2$) die statistische Sicherung (nicht gesichert, wahrscheinlich, gesichert) abgelesen.

Korrelationsrechnung (KOLLER³⁷)

Bei der Betrachtung zweier quantitativer Merkmale wie z. B. der Abhängigkeit der Fermentaktivität von den Cyclustagen (Exopeptidaseaktivität) gehört je ein Wertpaar zusammen und wird durch einen Punkt im Koordinatennetz dargestellt. Zur statistischen Kennzeichnung dient der Korrelationskoeffizient r_{xy} , der die gemeinsame Variation von x und y bzw. die Strammheit eines linearen Zusammen-

hanges zwischen x und y mißt³⁷. Es wird zunächst — analog zu den Abweichungsquadraten — die Summe der Abweichungsprodukte

$$s_{xy} = \sum_{i=1}^n (xi - \bar{x}) \cdot (yi - \bar{y})$$

berechnet.

Nach Normierung durch Division mit $s_x \cdot s_y$ erhält man den Korrelationskoeffizienten

$$r_{xy} = \frac{s_{xy}}{(n-1) \cdot s_x \cdot s_y} = \frac{s_{xy}}{s_{xx} \cdot s_{yy}}$$

r liegt zwischen -1 und $+1$. Bei Fehlen eines Zusammenhange ist $r = 0$. Die Korrelation zwischen dem proteolytischen Koeffizient C_1 (Glycyl-leucin) und den Cyclustagen wird z.B. folgendermaßen berechnet:

n	t	C_1	$t - \bar{t}$	$c_1 - \bar{c}$	$(t - \bar{t})^2$	$(c_1 - \bar{c})^2$	$(t - \bar{t}) \cdot (c_1 - \bar{c})$
1	21	99,6	-4	+42,5	16	1806,25	-170,0
2	21	64,2	-4	+7,1	16	50,41	-28,4
3	24	66,7	-1	+9,6	1	92,16	-9,6
4	24	42,3	-1	-14,8	1	219,04	+14,8
5	24	67,3	-1	+10,2	1	104,04	-10,2
6	25	63,6	0	+6,5	0	42,25	0
7	26	65,3	+1	+8,7	1	67,24	+8,7
8	26	36,2	+1	-20,9	1	436,81	-20,9
9	26	56,4	+1	-0,7	1	0,49	-0,7
10	27	36,3	+2	-20,8	4	432,64	-41,6
11	28	57,8	+3	+0,7	9	0,49	+2,1
12	28	29,9	+3	-27,2	9	739,84	-81,6
Summen	300	685,9	0	+0,9	60	3991,66	-363,0 + 25,1 -334,9

$$\text{Mittelwert } \bar{t} = \frac{300}{12} = 25,0, \quad \bar{c}_1 = \frac{658,9}{12} = 54,87$$

Summe der Abweichungsquadrate:

$$S_{tt} = 60 \quad S_{cc} = 3991,66 - \frac{0,81}{12} = 3991,59$$

Mittlere Abweichung:

$$s_t = \sqrt{\frac{60}{11}} = 2,34 \quad s_c = \sqrt{\frac{3991,59}{11}} = 19,0$$

$$s_{tc} = -334,9 - \frac{0 \cdot 0,9}{12} = -334,9$$

der Korrelationskoeffizient

$$r_{tc} = \frac{-334,9}{\sqrt{60 \cdot 3991,59}} = -0,684.$$

Der Korrelationskoeffizient stellt ein Maß für die Neigung der Regressionsgeraden dar und ist so berechnet, daß die Summe der Abweichungen der Einzelquadrate

von dieser Geraden möglichst klein wird. Um die Beziehung zwischen der Fermentaktivität und den Cyclustagen deutlich zu machen, wurden die Regressionsgeraden in die Abbildung eingezeichnet. Hierbei muß einerseits der Korrelationskoeffizient der mittleren Schwankungsbreite von Tagen (t) und Spaltungswerten (t') sowie andererseits das Verhältnis von Ordinaten- zum Abszissenmaßstab berücksichtigt werden. Für die Einzeichnung ergab sich folgende Rechnung (Beispiel Glycyl-l-leucin-Peptidase, Abb. 6):

Neigung der Korrelationsgeraden $= \operatorname{tg} \alpha = \frac{s_{t'}}{s_t} \cdot r_{tc} \cdot \frac{10}{50}$ und für die Streuungsgrenzen im Maßstab der Zeichnung

$$z = \pm s_{t'} \cdot \left| 1 - r_{tc}^2 \right|$$

Untersuchungsergebnisse

Glycyl-l-leucin (GL)-Dipeptidase

Aus der Reihe der Dipeptidasen konnte eine speziell auf die Glycyl-l-leucinspaltung eingestellte Dipeptidase abgetrennt werden, die Glycyl-l-leucin-Dipeptidase⁷⁵.

Das Enzym besitzt die Spezifität einer Dipeptidase, da Carbobenzoxylglycyl-l-leucin, Carbobenzoxylglycyl-l-leucinamid und Glycyl-l-leucinamid nicht angegriffen werden⁷⁵. Außer Glycyl-l-leucin werden noch Sarcosyl-l-leucin⁷⁵ und β -alanyl-l-leucin²⁶ hydrolysiert. Für die Wirkung der spezifischen Dipeptidase ist eine freie oder einfach methylierte Aminogruppe und eine freie Carboxylgruppe in Nachbarschaft der Peptidbindung im Substrat, sowie die spezifische Konfiguration des Glycyl-l-leucins oder eine sehr ähnliche Struktur erforderlich⁷⁵. Für die Enzyme aus verschiedensten tierischen Geweben scheint Mn^{II} zur Aktivierung benötigt zu werden (Rattenmuskel, Darmschleimhaut)⁷⁹. Die Spaltung des GL durch Uterusmuskulatur soll durch Zn^{II} aktiviert werden⁷⁴. Untersuchungen am Endometrium über die Glycyl-l-leucin-Dipeptidase lagen bisher noch nicht vor. Für unsere Untersuchungen wurde das Peptid Glycyl-l-leucin (Firma Roche) verwandt*.

Stabilität der GL-Dipeptidase

Um die Fermentbeständigkeit festzustellen, wurde in mehreren Versuchen die Enzymaktivität unmittelbar nach der Materialentnahme und in verschiedenen Zeitspannen danach bestimmt. Die Aufbewahrung der Enzymlösung erfolgt bei 5° C. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die Tabelle zeigt, daß das Enzym im Vergleich zu anderen Dipeptidasen nicht sehr stabil ist. Bei Aufbewahrung bei 5° C ist 10 Std nach der Materialentnahme noch kein Aktivitätsverlust festzustellen. Nach 24 Std dagegen ist bereits ein deutlicher Aktivitätsabfall (etwa

* Der Firma Roche sei auch an dieser Stelle für die Überlassung von Versuchsmengen gedankt.

Tabelle 2. Stabilität der GL-Dipeptidase des Endometriums (Aufbewahrung 5°)

Vers.-Nr.	Prot.-Nr.	C I-Zeit	1. Bestimmung Hy-%	Zeit nach 1. Bestimmung Std oder Tage	2. Bestimmung Hy-%	H Aktivitäts- verlust in %
1	88/57	45	70,5	10 Std	69,5	1,4
2	1060/56	45	47,5	24 Std	35,3	25,6
3	1018/56	45	37,6	24 Std	26,6	29,2
4	224/57	45	54,2	24 Std	40,0	26,2
5	225/57	45	54,2	2 Tage	42,8	20,0
6	221/57	45	64,0	7 Tage	44,2	31,6
7	625/57	10	15,3	8 Tage	10,5	41,3
		20	38,0		20,9	
		30	56,2		32,3	

25°) aufgetreten. Nach 7–8 Tagen ist die GL-Dipeptidaseaktivität um etwa 30–40% geringer als nach der Materialentnahme.

p_H-Optimum der GL-Hydrolyse

Zur Ermittlung des p_H-Wirkungsmaximums der GL-Dipeptidase des Endometriums wurde die Fermentaktivität bei verschiedenem p_H

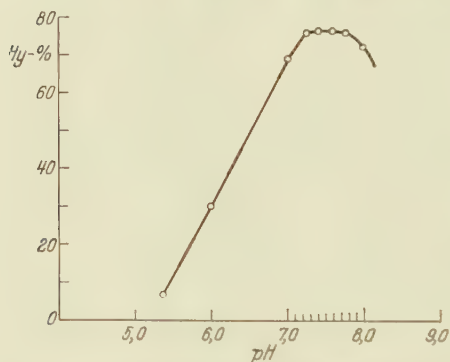


Abb. 3. p_H-Optimum der Glycyl-L-leucin-Hydrolyse (Endometrium 625/56). Ordinate: Gespaltene Menge des Glycin-L-leucin in Prozent der Ausgangsmenge. Abszisse: p_H. Standardansatz. Substratkonzentration 0,05 M. Gewebekonzentration 0,1% Homogenat = 0,001 g Frischgewebe je ml Enzymlösung. 0,15 M Phosphatpuffer (nach SØRENSEN). Inkubationszeit 45 min 37°

(*t* = 37° C) in 0,15 M Phosphatpuffer (nach SØRENSEN) bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 3 graphisch dargestellt. Wie aus der Abbildung hervorgeht, wird GL unter den gewählten Versuchsbedingungen durch das Endometriumhomogenat im schwach alkalischen Bereich zwischen p_H 7,2 und p_H 7,6 optimal gespalten. In Richtung des sauren Bereichs zu sinkt die Fermentaktivität relativ schnell ab.

Zeitlicher Verlauf der GL-Hydrolyse

Um den zeitlichen Verlauf der GL-Hydrolyse festzustellen, wurden Endometriumhomogenate in verschiedenen Konzentrationen unter Standardbedingungen verschieden lange inkubiert. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Zeit-Umsatz-Kurven sind in Abb. 2a in dekadischem Maßstab und in Abb. 2b halblogarithmisch aufgetragen. Es ist zu erkennen, daß die Spaltung des GL in erster Annäherung nach einer Reaktion erster Ordnung verläuft.

Abhängigkeit der GL-Hydrolyse von der Enzymkonzentration

Um festzustellen, ob die GL-Hydrolyse von der Enzymkonzentration abhängig ist, wurde die GL-Hydrolyse nach Zugabe verschieden stark verdünnter Endometrium-homogenaten bestimmt. In Abb. 4

Abb. 4. Abhängigkeit der Glycyl-l-leucin-Hydrolyse von der Enzymkonzentration. Ordinate: Reaktionskonstante K_1 ; —○—○— Endometrium 625/56; —●—●— Endometrium 620/56. Abszisse: Homogenatkonzentration in Prozent. Standardansatz. Substratkonzentration 0,05 M, Gewebekonzentration variiert, 0,15 M Phosphatpuffer (nach SØRENSEN) pH 7,2. Inkubationszeit: Endometrium 620/56 45 und 90 min; Endometrium 625/56 10 und 40 min. Temperatur 37°

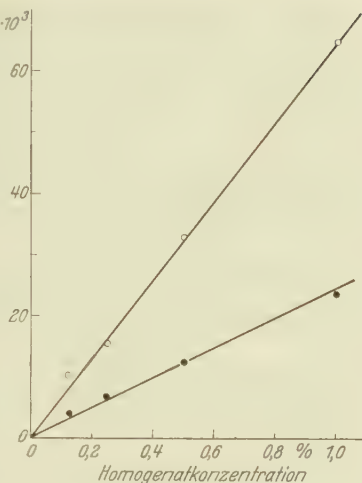


Tabelle 3. Zeitlicher Verlauf der GL-Hydrolyse durch Endometriumhomogenat

Nr.	Prot.-Nr.	Ges.-N Konzentration des Homog. (%)	I-Zeit min	Hy-	$K_0 \cdot 10^3$	$K_1 \cdot 10^3$	$\bar{C}_1 \cdot 10^3$
1	648/56	0,0142 (0,1%)	30	14,3	4,77	2,15	1,51
			60	24,0	4,00	1,96	1,38
			90	29,0	3,22	1,66	1,17
			180	45,7	2,54	1,49	1,05
2	643/56	0,0128 (0,1%)	30	18,0	6,00	2,88	2,25
			60	31,8	5,30	2,79	2,18
			90	44,2	4,91	2,81	2,19
			120	54,0	4,50	2,80	2,19
			180	68,0	3,78	2,74	2,14
3	623/56	0,0133 (0,1%)	10	12,0	12,00	4,74	3,56
			20	24,0	12,00	5,86	4,41
			30	34,0	11,33	5,97	4,49
			40	42,0	10,50	5,88	4,42
			50	51,0	10,20	6,19	4,65
4	625/56	0,0238 (0,125%)	10	15,3	15,3	7,2	3,02
			20	38,0	19,0	10,3	4,33
			30	56,2	18,7	11,2	4,70
			40	64,6	16,1	11,2	4,70
5	625/56	0,0475 (0,25%)	10	32,2	32,2	16,7	3,51
			20	54,2	27,1	16,9	3,56
			30	68,5	22,8	16,7	3,51
			40	82,0	20,5	18,6	
6	625/56	0,095 (0,5%)	10	55,2	55,2	34,8	3,66
			20	77,2	38,6	32,1	3,38
			30	87,6	29,1	30,2	3,18
			40	96,0	24,0	34,9	
7	625/56	0,190 (1,0%)	10	77,2	77,2	64,1	3,37
			20	95,3	47,6	66,4	3,49

Tabelle 4. *Gl-Hydrolyse durch Endometriumhomogenat. Einfluß von Aktivatoren oder Hemmstoffen*

Vers.-Nr.	Prot.-Nr.	Ges.-N	Zugegebene Substanz	Konzentration der zugegebenen Substanz	I-Zeit min	Hy-% ohne Zusatz	Hy-% mit Zusatz	Inkubationsmedium
1	686/56	0,0148	CuSO ₄	0,001 M	90	70,0	2,0	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
2	699/56	0,0145	ZnSO ₄	0,005 M	45 90	60,8 87,5	59,9 76,2	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
3	712/56	0,0152	ZnSO ₄	0,001 M	45 90	22,8 51,4	23,8 40,0	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
4	1060/56	0,0178	ZnSO ₄	0,001 M	45 90	3,0 18,0	10,0 16,0	Veronalpuffer 0,15 M pH 7,2
5	687/57	0,0182	ZnSO ₄	0,001 M	120	23,0	13,0	Veronalpuffer 0,04 M pH 8,0
6	432/57	0,00154	ZnSO ₄	0,001 M	45 90	0,0 2,0	7,0 20,0	H ₂ O
7	432/57	0,0077	ZnSO ₄	0,001 M	60 240	5,0 3,0	9,0 11,0	H ₂ O
8	648/56	0,0142	ZnSO ₄	0,001 M	30 60 120 180	14,3 24,0 29,0 45,7	4,0 8,0 15,0	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
9	615/56	0,0175	ZnSO ₄	0,001 M	30 60	29,0 55,0	18,0 37,1	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
10	902/56	0,0165	ZnSO ₄	0,001 M	30	8,0	0,0	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
11	850/56	0,0165	CdSO ₄	0,001 M	90	48,6	8,5	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
12	850/56	0,0165	HgCl ₂	0,001 M	90	48,6	2,0	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
13	902/56	0,0165	Ti ₂ SO ₄	0,001 M	30	8,0	9,0	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
14	1018/56	0,0162	K ₂ CrO ₄	0,001 M	90	44,7	42,8	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
15	1018/56	0,0162	Na ₂ MoO ₄	0,001 M	90	44,7	36,2	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
16	902/56	0,0165	Na ₂ WO ₄	0,001 M	30	8,0	10,0	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
17	1018/56	0,0162	UO ₂ (NO ₃) ₂	0,001 M	90	44,7	30,4	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
18	615/56	0,0133	MnSO ₄	0,0001 M	30 60 90 150	29,0 55,0 74,0 97,5	12,4 28,3 — 66,5	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
19	615/56	0,0133	MnSO ₄	0,001 M	30 60 90 150	29,0 55,0 74,0 97,5	1,9 — — 9,6	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Vers.- Nr.	Prot.- Nr.	Ges.-N	Zugegebene Substanz	Konzentration der zugegebenen Substanz	1- Zeit min	Hy-% ohne Zu- satz	Hy-% mit Zu- satz	Inkubations- medium
20	648/56	0,0142	MnSO ₄	0,001 M	30 60 90 180	14,3 24,0 29,0 45,7	6,0 9,0 18,0 —	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
21	625/56	0,190	MnSO ₄	0,001 M	10 20 30 40	77,2 95,3 — —	28,0 50,0 61,0 83,0	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
22	1018/56	0,0162	FeSO ₄	0,001 M	90	44,7	18,1	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
23	1018/56	0,0162	FeNH ₄ (SO ₄) ₂	0,001 M	90	44,7	17,2	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
24	686/56	0,0148	Co(NO ₃) ₂	0,001 M	90	70,0	2,0	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
25	686/56	0,0148	NiSO ₄	0,001 M	90	70,0	41,8	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
26	686/56	0,0148	MgSO ₄	0,001 M	90	70,0	58,2	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
27	1018/56	0,0162	CaCl ₂	0,005 M	45 90	26,6 44,7	23,8 33,3	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
28	686/56	0,0148	Li ₂ SO ₄	0,001 M	90	70,0	46,8	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
29	1018/56	0,0162	KJ	0,001 M	90	44,7	42,8	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
30	1018/56	0,0162	KBr	0,001 M	45 90	26,6 44,7	28,6 43,7	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
31	1018/56	0,0162	NaCl	0,001 M	45 90	26,6 44,7	25,0 44,2	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
32	1018/56	0,0162	Na ₂ P ₂ O ₄	0,001 M	90	44,7	45,8	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
33	1018/56	0,0162	CH ₃ H ₄ (OH) (COONa) ₃	0,001 M	90	44,7	51,4	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
34	1042/56	0,0134	CH ₃ H ₄ (OH) (COONa) ₃	0,001 M	45 90	52,3 81,8	52,3 80,0	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
35	1018/56	0,0162	Cystein- hydrochlorid	0,001 M	45 90	26,0 44,7	17,1 30,5	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2
36	850/56	0,0165	Ascorbin- säure	0,001 M	90	48,6	40,5	Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,2

sind die Mittelwerte für die Reaktionskonstanten für die prozentuale Spaltung K_1 bei 45 und 90 min (End. 620/56) Inkubationszeit und für End. 625/56 bei 10—40 min Inkubationszeit graphisch dargestellt. Es ergibt sich, daß K_1 für zwei verschiedene Enzymlösungen bis etwa 1% Homogenat proportional der Enzymkonzentration ist.

Aktivierung und Hemmung

In einer Reihe von Versuchen wurde der Einfluß verschiedener Substanzen auf die GL-Hydrolyse durch Endometriumhomogenat untersucht. Der Zusatz dieser Aktivatoren oder Hemmstoffe erfolgte in der angegebenen Konzentration vor der Inkubation. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 dargestellt. Die GL-Hydrolyse durch ungereinigten Endometriumextrakt wird unter den gewählten Versuchsbedingungen durch Zugabe von Ti^{II} , Wo^{VI} , KJ , KBr , NaCl , $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_4$, Na-Citrat und Cr^{VI} nicht beeinflusst. Durch Cu^{II} , Cd^{II} , H_2^{II} , Mo^{VI} , U^{VI} , Mn^{II} , Fe^{II} , Co^{II} , Ni^{II} , Li^{I} , Mg^{II} , Ca^{II} , Cystein, Ascorbinsäure wird sie mehr oder weniger gehemmt. Unter den gewählten Versuchsbedingungen führte die Zugabe von Zn^{II} in Phosphatpuffer zu einer Hemmung der GL-Hydrolyse. In Veronalpuffer war sie geringer, während in H_2O eine leichte Aktivierung eintrat.

GL-Dipeptidaseaktivität im Endometrium während verschiedener Cyclusphasen

Gewählte Versuchsbedingungen.

Aktivitätsbestimmungen 6–8 Std nach Materialentnahme. Standardansatz: 0,05 M Substratkonzentration. 0,15 M Phosphatpuffer nach SØRENSEN, pH 7,2.

Gewebehomogenatkonzentration

0,1% = 0,001 g Frischgewebe je Millimeter Enzymlösung. Für die Bestimmung der Aktivität: Reaktionskonstante 1. Ordnung = K_1 (s. S. 668). Proteolytischer Koeffizient C_1 (siehe S. 669).

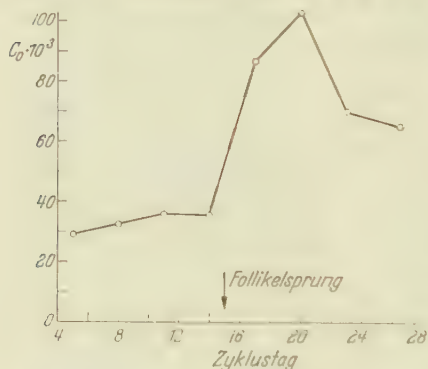


Abb. 5. Glycyl-L-leucin-Dipeptidase-Aktivität im Endometrium während des Cyclus. Gruppenmittelwertskurve des proteolytischen Koeffizienten für je 3 bzw. 4 Cyclustage. Ordinate: Proteolytischer Koeffizient c_1 . Abszisse: Cyclustage

An 19 Endometrien aus der Proliferations- und 17 Endometrien aus der Sekretionsphase wurde die GL-Dipeptidaseaktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5a und b zusammengefaßt.

Die GL-Dipeptidaseaktivität ist in der Sekretionsphase ($\bar{C}_1 = 59,69 \pm 4,7$) statistisch gesichert höher als in der Proliferationsphase ($C_1 = 24,72 \pm 2,1$). Die Gruppenmittelwertskurve für C_1 für jeweils 3 bzw. 4 Cyclustage (Abb. 5) zeigt in der Proliferationsphase einen ansteigenden Verlauf, eine Gipfelbildung in der frühen Sekretionsphase und einen Abfall gegen das Cyclusende zu. In Abb. 6 wurden die $\bar{C}_1$ -Einzelwerte gegen die Cyclustage aufgetragen und die Regressionsgeraden mit ihren Streubereichen eingezeichnet. Durch die Korrelationsrechnung kann

Tabelle 5a. *GL-Hydrolyse. Endometrium der Proliferationsphase*

Lfd. Nr.	Cyclustag	Prot.-Nr.	Ges.-N	I-Zeit min	Hy-%	$K_1 \cdot 10^4$	$\bar{C}_1 \cdot 10^3$
1	5	792/57	0,0234	45 90	20,8 29,5	22,3 16,9	8,4
2	6	1235/56	0,0138	45 90	33,3 53,3	39,1 36,8	27,4
3	8	1062/56	0,0138	45 90	20,9 36,2	22,4 21,4	15,9
4	8	541/57	0,0143	45 90	32,5 54,5	38,0 38,0	26,8
5	9	846/56	0,0169	45 90	26,6 45,7	29,8 29,5	17,5
6	9	712/56	0,0152	45 90	22,8 51,4	25,3 34,9	19,8
7	10	850/56	0,0187	45 90	31,4 48,6	36,6 32,0	18,4
8	11	931/56	0,0216	45 90	37,1 65,7	44,7 51,4	22,2
9	11	976/56	0,0168	45 90	33,3 45,7	39,1 29,5	20,4
10	11	793/56	0,0147	45 90	30,2 48,6	34,5 32,0	22,6
11	11	1060/56	0,0178	45 90	39,1 53,3	47,8 35,8	23,5
12	12	902/56	0,0166	45 90	42,8 68,6	54,0 56,0	33,1
13	12	773/56	0,0169	45 90	43,8 62,8	55,6 47,7	30,5
14	12	1018/56	0,0165	45 90	37,1 56,2	44,7 40,2	25,7
15	13	787/56	0,0165	45 90	54,3 74,2	75,7 65,4	42,7
16	14	947/56	0,0129	45 90	38,1 56,2	46,6 39,8	33,5
17	14	686/56	0,0148	45 90	41,8 71,4	51,2 60,3	37,3
18	15	789/56	0,0127	45 90	19,2 33,3	20,7 19,6	15,8
19	15	11/57	0,0127	45 90	34,3 47,6	40,4 31,3	28,2

 $n = 19$ Mittelwert für $\bar{C}_1$ in der Proliferationsphase = 24,72.Standardabweichung $s = \pm 9,24$; Mittlere Abweichung des Mittelwertes $= s_{r1} = \pm 2,12$. Korrelationsrechnung 5.—14. Cyclustag gegen Spaltungswerte $\bar{C}_1$ ($n = 17$) (Werte vom 15. Tag unberücksichtigt). $\bar{t} = 10,35$ $\bar{C}_1 = 25,44$ $s_{\bar{t}} = \pm 2,57$ $s_{C1} = 8,52$.Korrelationskoeffizient $r_{tc} = +0,72$. Existenzprüfung der Korrelation: Statistische Sicherheit $< 99,7\% \sim 3\sigma$, statistisch gesichert.Streuungsgrenze im Maßstab der Zeichnung $\pm 8,52$.

Tabelle 5b. *GL-Hydrolyse. Endometrium der Sekretionsphase*

Lfd. Nr.	Cyclustag	Prot.-Nr.	Ges.-N.	I-Zeit min	Hy. %	$K_1 \cdot 10^4$	$\bar{C}_1 \cdot 10^2$
1	14	781/56	0,0165	45	54,2	75,0	49,2
				90	83,6	87,3	
2	17	705/56	0,0131	45	55,2	76,9	53,7
				90	73,3	63,8	
3	18	790/56	0,0116	45	45,6	58,3	46,3
				90	64,5	49,9	
4	18	88/57	0,0112	45	70,5	118,0	90,6
				90	82,8	85,0	
6	18	1228/56	0,0162	45	81,0	160,5	89,4
				90	93,2	129,8	
7	21	75/57	0,0130	45	71,4	121,0	99,6
				90	94,3	138,0	
8	21	1350/56	0,0157	45	64,8	100,5	64,2
9	24	362/57	0,0207	30	61,0	140,0	66,7
				60	84,7	136,0	
11	24	991/56	0,1144	45	46,8	61,0	42,3
12	24	432/57	0,0154	30	48,6	96,0	67,3
				60	78,2	111,0	
13	25	845/56	0,0148	45	66,7	106,0	63,6
				90	81,8	82,3	
14	26	699/56	0,0141	45	60,8	90,3	65,3
				90	85,7	93,8	
15	26	942/56	0,0152	45	44,8	57,3	36,2
				90	66,6	52,8	
16	26	1042/56	0,0134	45	52,3	71,6	56,4
				90	80,8	79,6	
17	27	688/56	0,0182	45	50,5	76,2	36,3
				90	68,6	55,8	
18	28	839/56	0,0158	45	65,7	103,4	57,8
				90	80,7	79,4	
19	28	661/57	0,0150	45	40,0	50,7	29,9
				90	55,0	39,2	

 $n = 17$.Mittelwert für C_1 in der Sekretionsphase = 59,69. $s = \pm 19,44$ $s_{C_1} = \pm 4,71$.Korrelationsrechnung 21. - 28. Cyclustag gegen Spaltungswerte C_1 ($n = 12$) (Werte vom 14., 17., 18. Tag unberücksichtigt.) $t = 25,0$ $C_1 = 57,18$ $s_t = \pm 2,34$ $s_{C_1} = \pm 19,0$.Korrelationskoeffizient $r_{tc} = -0,684$.Existenzprüfung der Korrelation: statistische Sicherheit zwischen 95 und 99%, zwischen 2 und $2,6\sigma$; wahrscheinlich. Streuungsgrenzen im Maßstab der Zeichnung = $\pm 13,9$.

gezeigt werden, daß die GL-Dipeptidaseaktivität während der Proliferationsphase mit fortschreitenden Cyclustagen ansteigt und während der Sekretionsphase gegen das Cyclusende zu abfällt. Bei der rein arithmetischen Mittelbildung wird die an- und absteigende Tendenz der GL-

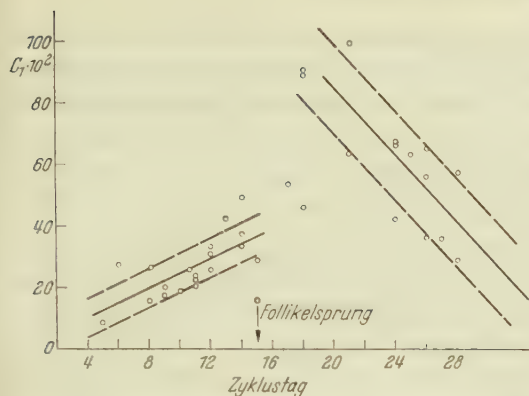


Abb. 6. Glycyl-l-leucin-Dipeptidase im Endometrium während des Cyclus. Ordinate: Proteolytischer Koeffizient $\bar{c}_1$. Abszisse: Cyclustag. Berechnete Regressionsgeraden mit ihren Streuungsgrenzen im Maßstab der Zeichnung

Tabelle 6. GL-Dipeptidaseaktivität in der Decidua bei glandulär-cystischer Hyperplasie bei Adenocarcinom

Lfd. Nr.	Prot.-Nr.	Ges.-N	I-Zeit	Hy-%	$\bar{C}_1 \cdot 10^2$
<i>Decidua</i>				$M = 50,95$	
1	633/57	0,0112	45	41,0	47,61
			90	68,5	
2	369/57	0,0132	45	54,2	54,28
			90	75,6	
<i>Glandulär-cystische Hyperplasie</i>				$M = 46,65 \pm 3,72$	
1	687/57	0,0182	45	52,8	39,8
2	727/56	0,0176	45	64,6	49,9
			90	79,0	
3	798/56	0,0174	45	64,6	57,8
			90	87,5	
4	814/56	0,0166	45	58,2	48,7
			90	80,0	
5	1472/56	0,0206	45	61,0	37,1
			90	72,4	
<i>Adenocarcinom</i>				$M = 48,1$	
1	705/57	0,0194	45	49,6	32,6
			90	71,4	
2	1009/56	0,0221	45	62,8	38,3
			90	78,2	
3	1471/56	0,0200	45	78,2	73,4

GL-Dipeptidaseaktivität bei glandulär-cystischer Hyperplasie und Adenocarcinom

Bei 5 Untersuchungen (Tabelle 6) betrug der proteolytische Koeffizient C_1 unter den gewählten Versuchsbedingungen im Mittel $\bar{C}_1 = 46,65$.

Dipeptidaseaktivität während des Cyclus verschleiert. Wegen der geringen Zahl der Untersuchungen blieben die Werte zwischen dem 15. und 18. Tag unberücksichtigt. Ein Wert vom 14. Tag wurde ebenfalls nicht in die Rechnung mit einbezogen, da er nach dem histologischen Bild der Sekretionsphase zuzuordnen war. Der Vergleich der Korrelationskoeffizienten der Proliferations- und Sekretionsphase ergibt eine statistisch gesicherte Differenz, d. h. der Anstieg der GL-Dipeptidaseaktivität in der Proliferations- und der Abfall der GL-Dipeptidaseaktivität in der Sekretionsphase während des Cyclus ist statistisch gesichert.

GL-Dipeptidaseaktivität der Decidua graviditatis

Nur an 2 Fällen von Schwangerschaftsdecidua konnte bisher die GL-Dipeptidaseaktivität bestimmt werden. Die ermittelten $\bar{C}_1$ -Werte (Tabelle 6) würden etwa der Aktivität des Endometriums vom Ende der Sekretionsphase entsprechen.

Der Wert entspricht etwa dem Mittelwert der GL-Dipeptidaseaktivität des normalen Endometriums vom Ende der Proliferationsphase. Der Unterschied ist gerade noch statistisch gesichert. Die Aktivität im Adenocarcinom des Corpus uteri scheint ebenfalls höher zu sein als im Endometrium während der Proliferation.

dl-Alanylglycin (AG)-Dipeptidase

Auf Grund der Untersuchungen von SMITH und BERGMANN⁷¹ (1944) kann man annehmen, daß in der Darmschleimhaut zwei verschiedene Enzyme vorkommen, von denen das eine Glycyl-l-alanin und das andere l-Alanylglycin hydrolysiert. l-Alanylglycin wird durch Extrakt der Darmschleimhaut schneller gespalten als irgendeine andere Substanz. Aus der Tatsache, daß das Enzym durch Sulfide in seiner Aktivität gehemmt wird, vermutet man, daß es sich um ein Metallprotein handelt*. Als Substrat wurde dl-Alanylglycin (Firma Roche) in einer Konzentration von 0,05M verwendet. Die Bestimmung der Peptidhydrolyse erfolgte nach GRASSMANN und HEYDE²¹ unter Standardbedingungen.

p_H-Optimum der AG-Hydrolyse

Um festzustellen, bei welcher Wasserstoffionenkonzentration die AG-Hydrolyse durch Endometrium ihr Wirkungsmaximum erreicht, wurde AG mit Endometriumhomogenat bei verschiedenen p_H 0,15 M (Phosphatpuffer nach SØRENSEN) bei 37° C inkubiert. Aus den Untersuchungen geht hervor, daß AG zwischen p_H 6,7 und 7,2 optimal gespalten wird.

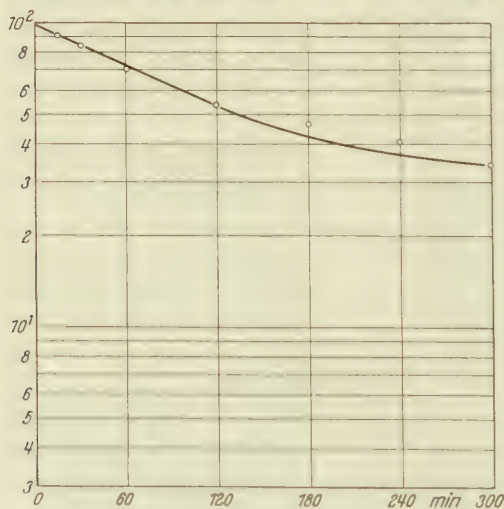


Abb. 7. Zeitlicher Verlauf der dl-Alanylglycin-Hydrolyse (Endometrium 773/56, halblogarithmisch dargestellt). Ordinate: Ungespaltenes Menge des dl-Alanylglycins in Prozent der Ausgangsmenge. Abszisse: Zeit in Minuten. Standardansatz; Substratkonzentration 0,05 M. Gewebekonzentration 0,1 % = 0,001 g Frischgewebe je ml Enzymlösung. 0,15 M Phosphatpuffer (nach SØRENSEN) p_H 7,2. Inkubation 37°

Zeitlicher Verlauf der AG-Hydrolyse

Die AG-Spaltung durch Endometriumhomogenat wurde nach verschieden langer Inkubationszeit ($t = 37^{\circ}\text{C}$) bestimmt. In Abb. 7 ist der

* Untersuchungen am Endometrium lagen bisher noch nicht vor.

zeitliche Verlauf der AG-Hydrolyse halblogarithmisch dargestellt. Es ist die ungespaltene Menge des AG in Prozent der Ausgangsmenge gegen die Zeit aufgetragen.

Aus der Abbildung geht hervor, daß die AG-Hydrolyse unter den gewählten Versuchsbedingungen in den ersten 2 Std annähernd wie eine Reaktion 1. Ordnung verläuft, da bis zu diesem Zeitpunkt die Werte auf einer Geraden liegen. Bei weiterer Hydrolyse erfolgt die Spaltung wie eine Reaktion höherer Ordnung (gekrümmter Kurvenverlauf). Bei den Untersuchungen an Endometrium wurde die Aktivität innerhalb des Reaktionsbereiches 1. Ordnung bestimmt, und dann die erhaltenen Hy-% nach K_1 berechnet.

Abhängigkeit der AG-Hydrolyse von der Enzymkonzentration

Um festzustellen, ob die AG-Hydrolyse von der Enzymkonzentration abhängig ist, wurde die Peptidhydrolyse durch Endometriumhomogenate verschiedene Konzentration bei gleicher Inkubationszeit (45 min) bestimmt. Werden die Reaktionskonstanten K_1 aus dem Prozentsatz der erhaltenen Spaltung errechnet und gegen die Homogenatkonzentration aufgetragen, so erhält man die in Abb. 8 dargestellte Kurve. Aus dieser Abbildung geht hervor, daß K_1 bis etwa 0,5% proportional der Enzymkonzentration ist.

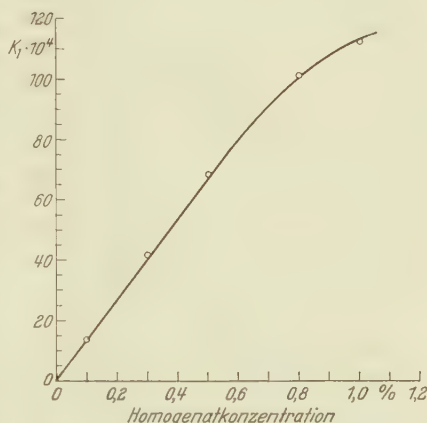


Abb. 8. Abhängigkeit der dl-Alanylglycin-Hydrolyse von der Enzymkonzentration. Ordinate: Reaktionskonstante K_1 . Abszisse: Homogenatkonzentration in Prozent. Standardansatz; Substratkonzentration 0,05 M. Gewebekonzentration variiert. 0,15 M Phosphatpuffer (nach SØRENSEN), pH 7,2. Inkubationszeit 45 min 37°

AG-Hydrolyse unter Zusatz von Aktivatoren bzw. Hemmstoffen

In einer Reihe von Versuchen wurde der Einfluß verschiedener Substanzen auf die AG-Hydrolyse durch Endometriumhomogenat untersucht. Der Zusatz dieser Aktivatoren oder Hemmstoffe erfolgte in der angegebenen Konzentration vor der Inkubation. Eine Aktivierung der AG-Hydrolyse durch die untersuchten Substanzen konnte nicht beobachtet werden. Unter den untersuchten Stoffen lassen Zn^{II} und Li^I die Hydrolyse nahezu unbeeinflusst oder hemmen nur in geringem Ausmaß. Cu^{II} , Co^{II} , Ni^{II} , Mg^{II} , Ca^{II} , Cystein und Ascorbinsäure hemmen die Fermentaktivität. Sehr stark hemmend wirkt Zugabe von Cd^{II} und Mg^{II} .

AG-Dipeptidaseaktivität im Endometrium während verschiedener Cyclusphasen

Gewählte Versuchsbedingungen

Aktivitätsbestimmungen 6–8 Std nach Materialentnahme. Standardansatz: 0,05 M Substratkonzentration, da nur L-Alanylglycin gespalten wird, ist die Substratkonzentration als 0,025 M anzunehmen. 0,15 M Phosphatpuffer nach SØRENSEN, pH 7,2. Gewebehomogenatkonzentration 0,1% = 0,001 g Frischgewebekomogenat je Milliliter Enzymlösung. Für die Bestimmung der Aktivität: Reaktionskonstante 1. Ordnung = K_1 . Proteolytischer Koeffizient C_1 .

An 19 Endometrien der Proliferations- und 19 Endometrien der Sekretionsphase wurde die AG-Dipeptidaseaktivität bestimmt. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 7a und b zusammengefaßt.

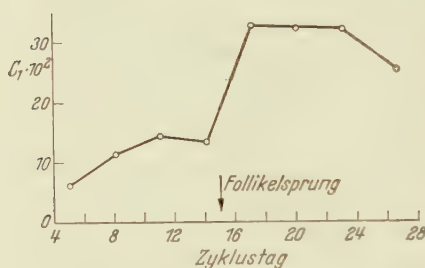


Abb. 9

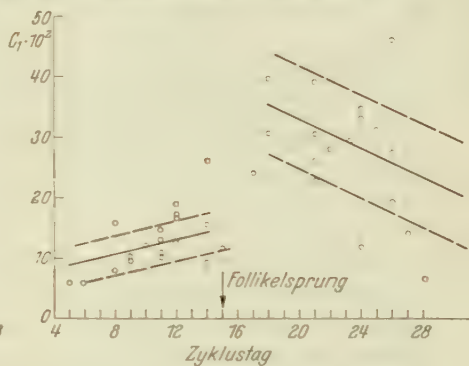


Abb. 10

Abb. 9. dl-Alanylglycin-Dipeptidase-Aktivität des Endometriums während des Cyclus. Gruppenmittelwertskurve des proteolytischen Koeffizienten für je 3 bzw. 4 Cyclustage. Ordinate: Proteolytischer Koeffizient $\bar{c}_1$. Abszisse: Cyclustag

Abb. 10. dl-Alanylglycin-Dipeptidase-Aktivität im Endometrium während des Cyclus. Ordinate: Proteolytischer Koeffizient c_1 für jedes Endometrium. Abszisse: Cyclustag. Berechnete Regressionsgeraden mit Streuungsgrenzen im Maßstab der Zeichnung

Die AG-Dipeptidaseaktivität ist in der Sekretionsphase ($\bar{c}_1 = 28,78 \pm 2,10$) signifikant höher als in der Proliferationsphase ($\bar{c}_1 = 12,19 \pm 0,86$). Die Gruppenmittelwertskurve steigt in der Proliferationsphase an, bildet in der frühen Sekretionsphase ein Plateau und fällt vor der Menstruation wieder ab (Abb. 9). In Abb. 10 sind die $\bar{c}_1$ -Einzelwerte gegen die Cyclustage aufgetragen und die errechneten Regressionsgeraden mit ihren Streubereichen eingezeichnet. Die statistische Sicherheit der Korrelationskoeffizienten ist zwar kleiner als 95%, jedoch ergibt der Vergleich des Anstiegs und des Abfalls der Korrelationsgeraden eine statistische Sicherheit von etwa 99% (etwa $2,5\sigma$), d.h. der Anstieg der AG-Dipeptidaseaktivität während der Proliferationsphase und der Abfall während der Sekretionsphase ist sehr wahrscheinlich.

AG-Dipeptidaseaktivität in der Decidua

Auch hier standen uns nur 2 Fälle zur Verfügung. In beiden untersuchten Gewebe war die Aktivität höher als in der Proliferationsphase.

Tabelle 7a. *AG-Dipeptidaseaktivität im Endometrium der Proliferationsphase*

Lfd. Nr.	Cyclustag	Prot.-Nr.	Ges.-N	I-Zeit min	Hy-%	$K_1 \cdot 10^4$	$C_1 \cdot 10^2$	$\bar{C}_1 \cdot 10^2$
1	5	792/57	0,0234	45 90	14,5 24,8	15,1 13,8	6,45 5,90	6,17
2	6	1235/56	0,0138	45 90	8,1	8,31	6,02	6,02
3	8	1062/56	0,0138	45 90	12,7 20,9	12,6 11,2	9,13 8,11	8,62
4	8	541/57	0,0143	30 60	14,5 27,3	22,7 22,8	15,9 15,9	15,9
5	9	846/56	0,0169	45 90	15,6 29,8	16,0 16,9	9,47 10,0	9,73
6	9	712/56	0,0152	45 90	16,3 26,2	16,8 14,5	11,0 9,53	10,26
7	10	850/56	0,0187	45 90	21,6 38,0	23,1 23,0	12,3 12,3	12,3
8	11	931/56	0,0216	45 90	34,6 38,1	41,0 23,0	19,0 10,6	14,8
9	11	976/56	0,0168	45 90	14,5 25,4	20,7 14,1	12,3 8,4	10,3
10	11	793/56	0,0147	45 90	16,0 28,4	16,8 16,3	11,4 11,0	11,2
11	11	1060/56	0,0178	45 90	24,7 33,6	27,5 19,9	15,4 11,2	13,3
12	12	902/56	0,0166	45 90	25,4 42,7	28,2 27,0	17,0 16,3	16,9
13	12	773/56	0,0169	45 90	27,4 44,0	31,1 27,8	18,4 16,4	17,4
14	12	1018/56	0,0165	45 90	20,9 34,5	22,3 20,5	13,5 12,4	13,0
15	12	787/56	0,0165	45 90	28,4 48,6	32,4 32,0	19,6 19,4	19,5
16	14	947/56	0,0129	45 90	18,3 20,9	19,2 11,1	14,9 8,6	15,7
17	14	686/56	0,0148	45 90	13,6 24,5	14,3 13,4	9,66 9,05	9,35
18	15	789/56	0,0127	45 90	14,5 26,4	15,1 14,8	11,9 11,6	11,75
19	15	11/57	0,0127	45 90	11,8 22,7	11,8 12,3	9,29 9,68	9,48

 $n = 19$.Mittelwert für $\bar{C}_1$ in der Proliferationsphase = 12,19. $s = \pm 3,76$ $s_{C_1} = \pm 0,86$.Korrelationsrechnung 5. – 15. Cyclustag gegen Spaltungswerte $\bar{C}_1$ ($n = 19$) $\bar{t} = 10,8$ $\bar{C}_1 = 12,2$ $s_{\bar{t}} = \pm 2,80$ $s_{\bar{C}_1} = 3,76$.Korrelationskoeffizient $r_{tc} = +0,442$.Existenzprüfung der Korrelation: statistische Sicherheit nahe an 95%. Streuungsgrenzen im Maßstab der Zeichnung = $\pm 3,4 < 2\sigma$.

Tabelle 7b. *AG-Dipeptidaseaktivität im Endometrium der Sekretionsphase*

Lfd. Nr.	Cyclustag	Prot.-Nr.	Ges.-N	I-Zeit min	Hy-%	$K_1 \cdot 10^4$	$C_1 \cdot 10^2$	$\bar{C}_1 \cdot 10^2$
1	14	781/56	0,0165	45	38,6	47,16	28,58	26,3
				90	56,0	39,55	23,97	
2	17	705/56	0,0131	45	28,2	31,78	24,26	24,3
3	18	790/56	0,0116	45	32,6	37,85	32,63	30,6
				90	49,8	33,21	28,63	
4	18	88/57	0,0112	45	36,4	43,53	38,86	35,5
				90	52,7	36,04	32,18	
5	18	733/57	0,0141	60	54,0	56,09	39,78	39,8
6	21	1228/56	0,0162	45	48,2	63,47	39,18	39,2
7	21	75/57	0,0130	45	39,1	47,74	36,72	30,5
				90	48,2	31,73	24,42	
8	21	1350/56	0,0157	45	36,4	43,54	27,73	22,7
				90	43,7	27,82	17,72	
9	21	362/57	0,0207	30	34,3	60,60	29,27	26,1
				60	48,3	47,60	22,99	
10	22	860/57	0,0202	30	32,4	56,77	28,10	28,1
11	24	991/56	0,0141	45	13,6	14,33	10,16	34,8
				90	16,1	83,89	59,50	
12	24	432/57	0,0154	30	30,0	51,77	33,61	33,1
				60	49,9	50,17	32,58	
13	25	845/56	0,0148	45	41,0	50,64	34,22	31,2
				90	58,0	41,84	28,27	
14	26	699/56	0,0141	45	49,1	64,95	46,06	46,1
15	26	942/56	0,0152	45	42,3	52,89	34,80	27,6
				90	47,3	30,98	20,38	
16	26	1042/56	0,0134	45	25,7	28,25	21,08	19,4
				90	39,1	23,87	17,81	
17	27	688/56	0,0182	45	23,6	26,07	14,32	14,1
				90	40,9	25,33	13,92	
18	28	839/56	0,0158	45	44,8	57,27	36,25	30,7
				90	56,4	39,98	25,30	
19	28	661/57	0,0150	60	13,0	10,12	6,747	6,75

$n = 19$.

Mittelwert für $\bar{C}_1$ in der Sekretionsphase = 28,78.

$s = \pm 9,16$ $s_{C_1} = \pm 2,10$.

Korrelationsrechnung 18. 28. Cyclustag gegen Spaltungswerte $\bar{C}_1$ ($n = 17$) (Werte vom 14. und 17. Tag unberücksichtigt).

$t = 23,2$ $C_1 = 29,2$ $s_t = \pm 3,45$ $s_{C_1} = \pm 9,60$.

Korrelationskoeffizient $r_{tc} = -0,429$.

Existenzprüfung der Korrelation: statistische Sicherheit $< 95\% < 2\sigma$. Streuungsgrenzen im Maßstab der Zeichnung $= \pm 8,6$.

Weitere Untersuchungen müßten zeigen, ob die Ergebnisse zu sichern sind.

AG-Dipeptidaseaktivität bei der glandulär-cystischen Hyperplasie und beim Adenocarcinom.

Die Fermentaktivität bei der glandulär-cystischen Hyperplasie und beim Adenocarcinom scheint größer zu sein als im proliferierenden Endometrium. Auf Grund der geringen Anzahl der Untersuchungen ist aber keine sichere Aussage möglich.

Glycylglycin (GG)-Dipeptidase

Nach den Untersuchungen von SMITH 1948⁷⁴ kommen im tierischen Gewebe Enzyme vor, die spezifisch Glycylglycin und das nahe verwandte Sarcosylglycin hydrolysieren, aber sonst kein anderes Dipeptid angreifen. Die Glycylglycin-Dipeptidase wird durch Co^{II} stark aktiviert, das teilweise auch durch Mn^{II} ersetzt werden kann. Bei 0,05 M Substratkonzentration folgt die enzymatische Spaltung den Gesetzen einer Reaktion 0. Ordnung. Das pH -Optimum liegt bei pH 7,6⁷⁹. Wird Glycylglycin mit Co^{II} bei pH 7,0–8,0 inkubiert, entwickelt sich eine rosa Farbe, die viel stärker ist als von Co^{II} allein oder von Co^{II} und Glykokoll oder von Glycylglylglycin⁷⁴. SMITH^{74, 76} vermutet eine spezifische Komplexverbindung, bei deren Bildung Co^{II} als Brücke in der Enzym-Substrat-Verbindung dienen soll⁷⁸. Diese Bindung ist stabil und zeigt nur geringe Tendenz zur Ionbildung⁷⁷. Außerdem deutet sie auf die Spezifität des Fermentes hin. Auf das Übersichtsreferat in SUMNER-MYRBÄCK von SMITH⁷³ wird verwiesen.

Als Substrat wurde Glycylglycin (Firma Roche) in einer Konzentration von 0,05 M verwendet. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten mit der Mikrotitration von GRASSMANN und HEYDE²¹.

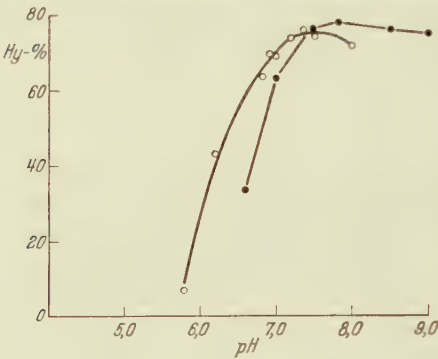
Stabilität der GG-Dipeptidase

Um die Stabilität der GG-Dipeptidase des Endometriums festzustellen, wurde in mehreren Versuchen die Fermentaktivität des Endometriumhomogenates unmittelbar nach der Gewebsentnahme und nach verschieden langer Aufbewahrung bei 5, 20 und 37° C bestimmt. Aus den Untersuchungen geht hervor, daß die GG-Dipeptidase des Endometriums bei 5° ziemlich stabil ist. Nach etwa 4tägiger Aufbewahrung bei 5° C macht sich nur ein geringer Aktivitätsverlust bemerkbar. Bei Zimmertemperatur und bei 37° C tritt schon nach kürzerer Zeit ein geringer Aktivitätsverlust von etwa 10% auf.

pH -Optimum der GG-Hydrolyse

Um den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Fermentaktivität festzustellen, wurde die GG-Hydrolyse durch Endometriumhomogenat bei verschiedenem pH ($t = 37^\circ \text{C}$) bestimmt. Dazu wurden 0,15 M Phosphatpuffer nach SØRENSEN bzw. 0,15 M Veronalpuffer

nach MICHAELIS verwendet. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abb. 11 graphisch dargestellt. Während bei Anwendung von Phosphatpuffer das Wirkungsoptimum der GG-Dipeptidase zwischen



pH 7,2 und 7,8 liegt, erfolgt in Veronalpuffer von pH 7,8 an die Bildung eines leicht abfallenden Plateaus.

Abb. 11. pH-Optimum der Glycylglycin-Hydrolyse (Endometrium 351/56). —○—○— 0,15M Phosphatpuffer (nach SØRENSEN); —●—●— 0,15M Veronalpuffer (nach MICHAELIS). Ordinate: Gespaltene Menge in Prozent der Ausgangsmenge (Hy-%). Abszisse: pH. Gewebekonzentration 1% Homogenat = 0,010 g Frischgewebe je ml Enzym-lösung. Inkubationszeit 45 min

Zeitlicher Verlauf der GG-Hydrolyse

Durch Inkubation bis zu 10 Std wurde der zeitliche Verlauf der GG-Spaltung durch 1% Endometriumhomogenat ermittelt. Die un-

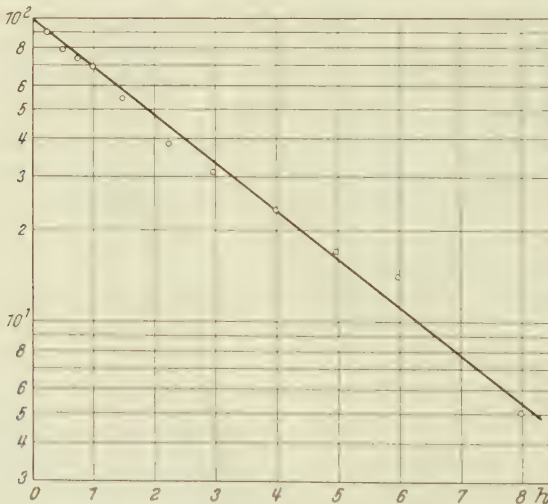


Abb. 12. Zeitlicher Verlauf der Glycylglycin-Hydrolyse (Endometrium 351/56). Ordinate: Ungespaltene Menge des Glycylglycin in Prozent der Ausgangsmenge (halblogarithmisch). Abszisse: Zeit in Stunden. Standardansatz. Substratkonzentration 0,05 M. Gewebekonzentration 1% Homogenat = 0,010 g Frischgewebe je ml Enzym-lösung. 0,15 M Phosphatpuffer (nach SØRENSEN) pH 7,2. Inkubation 37°

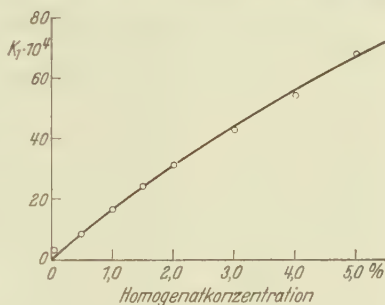
gespaltene Menge des GG in Prozent der Ausgangsmenge in Abhängigkeit von der Zeit ist in Abb. 12 halblogarithmisch dargestellt. Bei dieser Art der Darstellung ergibt sich annähernd eine Gerade, woraus geschlos-

sen werden kann, daß die GG-Hydrolyse in der Anfangszeit annähernd den Gesetzen einer 1. Ordnungsreaktion folgt.

Abhängigkeit der GG-Hydrolyse von der Enzymkonzentration

Um die Abhängigkeit der GG-Spaltung von der Enzymkonzentration zu untersuchen, wurde die Fermentaktivität im Standardansatz unter Zugabe verschiedener Homogenatverdünnungen bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 45 und 90 min (37°C). In Abb. 13 sind die Mittelwerte der Reaktionskonstanten K_1 für die prozentuale Spaltung bei 45 und 90 min Inkubation graphisch dargestellt. Aus der Abbildung geht hervor, daß K_1 unter den gewählten Versuchsbedingungen bei niedriger Homogenatkonzentration proportional der Enzymkonzentration ist.

Abb. 13. Abhängigkeit der Glycylglycin-Hydrolyse von der Enzymkonzentration (Endometrium 331/56). Ordinate: Reaktionskonstante 1. Ordnung, Mittelwert für 45 und 90 min Inkubationszeit, Abszisse: Homogenatkonzentration in Prozent. Standardansatz. Substratkonzentration 0,05 M. Gewebekonzentration variiert. 0,15 M Phosphatpuffer (nach SØRENSEN), pH 7,2. Inkubationszeit 45 und 90 min



Aktivierung und Hemmung der GG-Hydrolyse

In einer Reihe von Versuchen wurde der Einfluß verschiedener Substanzen auf die GG-Spaltung untersucht. Die Zugabe erfolgte in der angegebenen Konzentration zum Standardansatz. Auf die Darstellung der Untersuchungsergebnisse im einzelnen wird verzichtet. Aus den Untersuchungen geht hervor, daß die GG-Hydrolyse durch Co^{II} in einer Konzentration von 0,01 M gehemmt wird. Die Zugabe von Co^{II} in einer Konzentration von 0,001 M führt dagegen zu einer etwa 3-fachen Steigerung der GG-Dipeptidaseaktivität. Weniger stark ist die Aktivierung durch Mn^{II} in einer Konzentration von 0,001 M. Ti^{I} bewirkt möglicherweise eine geringe Aktivierung (die Abweichungen liegen aber innerhalb der Fehlergrenze). Durch Mo^{VI} , W^{VI} , $\text{Fe}^{\text{II-III}}$, Li^{I} , Mg^{II} , Ca^{II} , K, Na bleibt die GG-Hydrolyse entweder unbeeinflußt oder wird nur in geringem Maße gehemmt, desgleichen durch organische Lösungsmittel wie Chloroform, Äthanol und Phenol. Eine geringe Hemmung bewirkt Ascorbinsäure. Stärker gehemmt wird dagegen die Hydrolyse durch Zugabe von K_2CrO_4 , Zn^{II} , Ni^{II} , Arsensäure, Na-Citrat und Cystein. Eine starke Hemmung bewirken Cu^{II} , Ag^{II} , Cd^{II} , Hg^{II} und U^{VI} .

Von den untersuchten Sexualhormonen ist Oestronsulfat in der angegebenen niedrigen Konzentration ohne Einfluß (0,005–0,010 mg zum

Tabelle 8a. *GG-Dipeptidase-Aktivität. Endometrium der Proliferationsphase*

Lfd. Nr.	Cyclustag	Prot.-Nr.	Ges.-N	I-Zeit min	Hy- %	$K_1 \cdot 10^4$	$C_1 \cdot 10^2$	$\bar{C}_1 \cdot 10^2$
26	5	1121/57	0,172	45 90	6 11	5,62 5,46	0,327 0,317	0,322
1	5	792/56	0,234	45 90	16 25	16,8 13,8	0,718 0,590	0,654
22	5	508/56	0,193	45 90	12 17	12,6 08,8	0,653 0,456	0,534
27	6	584/56	0,224	45 90	19 34	20,0 19,9	0,893 0,888	0,890
2	6	1235/56	0,138	45 90	19,1 16,6	10,06 10,77	0,729 0,780	0,754
24	8	615/56	0,175	45 90	13 15	13,5 8,0	0,771 0,457	0,614
5	9	846/56	0,169	45 90	7 11	6,53 5,47	0,387 0,324	0,355
6	9	712/56	0,153	45 90	6 16	5,62 8,39	0,367 0,548	0,458
21	10	490/56	0,176	45 90	14 26	14,3 14,5	0,812 0,824	0,818
23	10	522/56	0,212	45 90	12 24	12,6 13,0	0,594 0,613	0,603
7	10	850/56	0,188	45 90	9 12	9,20 6,32	0,489 0,336	0,412
11	11	1060/56	0,178	45 90	12 25	12,6 13,8	0,708 0,775	0,741
8	11	931/56	0,216	45 90	6 10	5,62 5,03	0,260 0,233	0,246
10	11	793/56	0,148	45 90	5 11	4,71 5,47	0,318 0,297	0,307
13	12	773/56	0,169	45 90	11 16	10,9 9,60	0,645 0,568	0,606
15	13	787/56	0,165	45 90	12 18	12,6 7,17	0,745 0,434	0,589
25	14	781/56	0,165	45 90	9 14	9,20 7,17	0,557 0,434	0,495
20	15	337/56	0,134	45 90	10 20	16,06 10,08	0,750 0,752	0,751
18	15	789/56	0,172	45 90	11 14	10,9 7,17	0,634 0,417	0,525

 $n = 19$.Mittelwert für C_1 in der Proliferationsphase = 0,56.Standardabweichung $s = \pm 0,182$.Mittlere Abweichung des Mittelwertes $s\bar{C}_1 = \pm 0,042$.Korrelationsrechnung 5.-15. Cyclustag gegen $\bar{C}_1$ ($\bar{n} = 19$). $\bar{t} = 9,75$ $\bar{C}_1 = 5,62$ $s_{\bar{t}} = \pm 3,27$ $s_{\bar{C}_1} = \pm 1,82$.Korrelationskoeffizient $r_{tc} = 0,078$.

Existenzprüfung der Korrelation: keine Korrelation vorhanden.

Streuungsgrenzen im Maßstab der Zeichnung = $\pm 1,80$.

Tabelle 8b. *GG-Dipeptidase-Aktivität. Endometrium der Sekretionsphase*

Lfd. Nr.	Cyclustag	Prot.-Nr.	Ges.-N	1-Zeit min	Hy. %	$K_1 \cdot 10^4$	$C_1 \cdot 10^2$	$\bar{C}_1 \cdot 10^2$
30	16	548/56	0,188	45	29	33,1	1,76	1,72
				90	48	31,5	1,67	
32	17	623/56	0,133	45	12	12,6	0,947	0,879
				90	20	10,8	0,812	
2	17	705/56	0,131	45	15	16,0	1,22	1,033
				90	21	11,1	0,847	
25	18	493/56	0,120	45	33	38,4	3,20	3,24
				90	56	39,5	3,29	
3	18	790/56	0,116	45	12	12,6	1,09	0,958
				90	18	9,6	0,027	
4	18	88/57	0,112	45	28,6	32,5	29,0	2,78
				90	44,7	28,6	25,5	
33	20	798/56	0,174	45	42	52,3	3,00	2,66
				90	57	40,6	2,33	
28	21	521/56	0,137	45	28	31,8	2,32	2,20
				90	45	28,6	2,09	
7	21	75/57	0,130	45	33,3	39,1	30,1	3,34
				90	62,8	47,7	36,7	
6	21	1228/56	0,162	45	60,0	88,4	54,6	6,09
				90	89,6	101,0	67,3	
31	22	577/56	0,177	45	31	35,9	2,03	2,04
				90	53	36,5	2,06	
23	24	377/56	0,150	45	25	27,5	1,83	1,96
				90	48	31,5	2,10	
29	25	526/56	0,166	45	16	16,8	1,01	0,908
				90	24	13,4	0,807	
13	25	845/56	0,148	45	16	16,0	1,13	1,15
				90	30	17,3	1,17	
15	26	942/56	0,152	45	12	12,6	0,829	0,743
				90	19	9,99	0,657	
14	26	699/56	0,141	45	38	45,9	3,25	3,52
				90	67	53,5	3,79	
24	26	479/56	0,264	45	37	44,7	1,69	1,80
				90	65	50,7	1,92	
22	26	360/56	0,197	45	30	34,5	1,75	1,80
				90	53	36,5	1,85	
26	26	494/56	0,176	45	36	42,9	2,44	2,40
				90	58	41,8	2,37	
17	27	688/56	0,182	45	22	23,8	1,31	1,31
				90	39	23,9	1,31	
18	28	839/56	0,158	45	21	22,3	1,41	1,48
				90	40	24,7	1,56	
27	28	509/56	0,223	45	27	30,4	1,36	1,31
				90	44	27,8	1,25	

$n = 22$. Mittelwert für $\bar{C}_1$ in der Sekretionsphase = 2,06. $s = \pm 1,23$ $s\bar{C}_1 = \pm 0,262$. Korrelationsrechnung: 18. — 20. Cyclustag gegen Spaltungswerte C_1 ($n = 19$) (Werte vom 16., 17. Tag nicht berücksichtigt). $\bar{t} = 23,5$ $\bar{C} = 21,9$ $s\bar{t} = \pm 3,44$ $s\bar{C}_1 = \pm 13,0$. Korrelationskoeffizient $r_{tC_1} = -0,403$. Existenzprüfung der Korrelation: statistische Sicherheit < als 95%, < als 2σ . Streuungsgrenzen der Regressionsgeraden im Maßstab der Zeichnung = $\pm 11,9$.

Standardansatz), bei höherer Konzentration (0,025 mg) scheint eine leichte Hemmung der GG-Hydrolyse aufzutreten. Progesteron (Proluton C Schering 1 Vol.-% zum Ansatz) hat unter den gewählten Versuchsbedingungen keinen wesentlichen Einfluß auf die GG-Spaltung.

*GG-Dipeptidaseaktivität im Endometrium während verschiedener
Cyclushasen*

Gewählte Versuchsbedingungen

Aktivitätsbestimmungen 6–8 Std nach Materialentnahme. Standardansatz: 0,05 M Substratkonzentration. 0,15 M Phosphatpuffer nach SØRENSEN, pH 7,2. Gewebekonzentration 0,1% = 0,001 g Frischgewebe je Milliliter Enzymlösung. Für die Bestimmung der Aktivität: Reaktionskonstante 1. Ordnung = K_1 . Proteolytischer Koeffizient = C_1 .

An 19 Endometrien aus der Proliferations- und 22 Endometrien aus der Sekretionsphase wurde die GG-Dipeptidaseaktivität bestimmt. Die



Abb. 14

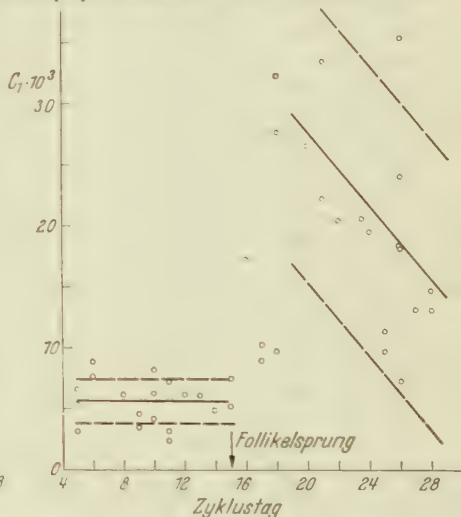


Abb. 15

Abb. 14. Glycylglycin-Dipeptidase im Endometrium während des Cyclus. Gruppenmittelwertskurve des proteolytischen Koeffizienten für je 3 bzw. 4 Cyclustage. Ordinate: Proteolytischer Koeffizient C_1 . Abszisse: Cyclustag

Abb. 15. Glycylglycin-Dipeptidase-Aktivität des Endometriums während des Cyclus. Ordinate: Proteolytischer Koeffizient (C_1) für jedes Endometrium. Abszisse: Cyclustag. Berechnete Regressionsgeraden mit ihren Streuungsgrenzen im Maßstab der Zeichnung

Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle Sa und b zusammengefaßt. Aus der Tabelle geht hervor, daß die GG-Dipeptidaseaktivität in der Sekretionsphase ($C_1 = 2,06 \pm 0,262$) statistisch gesichert höher ist als in der Proliferationsphase ($\bar{C}_1 = 0,56 \pm 0,042$). Bildet man aus den errechneten C_1 -Werten Gruppenmittelwerte für jeweils 3 bzw. 4 Cyclustage (z. B. 7., 9., 10. – 12. Cyclustag usw.) erhält man eine Mittelwertskurve, die in Abb. 14 dargestellt ist. Die Kurve verläuft in der Proliferations-

phase flach, bildet in der frühen Sekretionsphase einen Gipfel und fällt danach wieder steil ab. Diese Mittelwertskurve ist jedoch von fraglichem Wert, da die Gruppenbesetzung verschieden stark ist. In Abb. 15 sind die Einzelwerte des proteolytischen Koeffizienten gegen die Cyclustage aufgetragen. Ein Wert für den 21. Tag konnte aus Maßstabsgründen nicht aufgetragen werden. Es ist zu erkennen, daß in der Sekretionsphase der Streubereich sehr groß ist.

Die berechneten Regressionsgeraden mit ihren Streubereichen sind in Abb. 15 eingezeichnet. In der Proliferationsphase besteht keine Beziehung zwischen der Fermentaktivität und den Cyclustagen. In der Sekretionsphase scheint eine Korrelation zwischen den fortschreitenden Cyclustagen und dem Abfall der Fermentaktivität zu bestehen, sie ist aber statistisch noch nicht zu sichern. Wegen der geringen Anzahl der Fälle kann die Differenz der beiden Korrelationsgeraden nicht gesichert werden.

GG-Dipeptidaseaktivität bei glandulär-cystischer Hyperplasie und Adenocarcinom.

Bei der glandulär-cystischen Hyperplasie (7 Untersuchungen) ist die GG-Dipeptidaseaktivität im Mittel höher ($\bar{C}_1 = 1,38 \pm 0,016$) als die des proliferierenden Endometriums ($\bar{C}_1 = 0,56 \pm 0,042$). Der Unterschied ist statistisch gesichert.

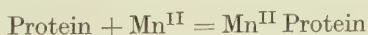
Die Aktivität im Adenocarcinom scheint ebenfalls etwas höher zu sein (Mittelwert $\bar{C}_1 = 1,77$). Eine statistische Sicherung läßt sich nicht durchführen.

L-Leucylglycin (LG)-Dipeptidase (Leucinaminopeptidase)

Die leucylpeptidspaltenden Fermente nehmen unter den Peptidasen eine Sonderstellung ein. Diese basiert auf den Untersuchungen von LINDERSTRØM-LANG^{41, 42} 1929/30, der feststellte, daß in der Darmschleimhaut ein Enzym vorkommt, das spezifisch die Peptide des Leucins spaltet. Später wurde von JOHNSON u. Mitarb.³⁴, 1936, sowie von SMITH und BERGMANN^{70, 71}, 1944, die Leucinaminopeptidase isoliert, gereinigt und angereichert.

Zur Bestimmung der Leucinaminopeptidase wurde sehr häufig L-Leucylglycin benutzt.

Die Leucinaminopeptidase gilt als Metallprotein, da sie durch Metallgifte, z. B. Cyanide oder Sulfide, gehemmt wird. Das dialysierte und gereinigte Enzym wird entweder durch Mn^{II} oder durch Mg^{II} aktiviert^{70, 80, 81, 70}. Die Aktivierung hängt in starkem Umfang von der Reinheit der Präparate ab⁸⁰. Bei Verdünnung des Enzyms tritt Dissoziation ein⁷², ohne daß Mn^{II} -Überschuß auftritt. Dabei kann die Gleichgewichtskonstante der Reaktion



durch Änderungen der Mn^{II} -Konzentration bei konstanter Proteinkonzentration untersucht werden. Unter den gewöhnlichen experimentellen Bedingungen erfolgt die Aktivierung durch Mn^{II} schneller als durch Mg^{II} ⁷⁹. In einigen Geweben scheint die Leucinaminopeptidase Mg^{II} zu enthalten, da ungereinigte Extrakte stark durch Citrat gehemmt werden. Citrat hemmt aber nicht andere Mn-aktivierte Peptidasen wie die Glycyl-L-Prolin-Dipeptidase oder die L-Prolyl-glycin-Dipeptidase⁷³. Das Wirkungsoptimum der L-Leucin-aminopeptidase liegt bei dem Enzym der Darmmucosa zwischen p_H 8,0 und 9,0^{34, 79}. Die Leucinaminopeptidasen aus Milz und Niere, die zum Kathepsinkomplex gerechnet werden, wirken optimal im schwach sauren Bereich bei p_H 5,0*. Als Substrat zum Nachweis der Leucinaminopeptidase wurde L-Leucyl-glycin (Firma Hoffmann-La Roche) in einer Konzentration von 0,05M verwendet.

Die Hydrolyse dieses Peptids wurde mit der Mikrotitration nach GRASSMAN und HEYDE²¹ bestimmt.

Stabilität der Leucinaminopeptidase

Um die Fermentbeständigkeit der Leucinaminopeptidase des Endometriums festzustellen, wurde in mehreren Versuchen die Enzymaktivität sowohl unmittelbar nach der Gewebseentnahme als auch nach verschieden langer Aufbewahrung bei 5° C bestimmt. Aus den Untersuchungen geht hervor, daß die Leucinaminopeptidase zunächst sehr stabil ist. Erst nach 4 Tagen ist ein deutlicher Aktivitätsabfall erkennbar. Nach 3 Wochen ist nur noch eine schwache Aktivität vorhanden.

p_H -Optimum der LG-Hydrolyse

Um den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Enzymaktivität festzustellen, wurde die LG-Hydrolyse durch Endometriumhomogenat bei verschiedenen p_H ($t = 37^{\circ} C$) in 0,15M Phosphatpuffer nach SØRENSEN bestimmt. Aus den Untersuchungen geht hervor, daß sich von p_H 7,0 ab im alkalischen Bereich ein Plateau ausbildet, während im schwach sauren Bereich die Aktivität rasch abfällt.

Zeitlicher Verlauf der LG-Hydrolyse

Um den zeitlichen Verlauf der LG-Hydrolyse festzustellen, wurden Spaltungsansätze bei konstanter Substrat- und Homogenatkonzentration verschieden lange bei 37° C inkubiert. Die Werte für die ermittelte prozentuale Spaltung sind in Abb. 16 graphisch dargestellt. Aus der Abbildung geht hervor, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen der zeitliche Verlauf der LG-Hydrolyse von der Ausgangsaktivität ab-

* Über die L-Leucylglycin-Hydrolyse durch Endometrium war bisher nichts bekannt.

hängt (s. Diskussion). Dann verläuft die Spaltung linear, d.h. nach einer Reaktion 0. Ordnung. Für die Aktivitätsbestimmungen am Endometrium wurde K_0 zugrunde gelegt.

Abhängigkeit der LG-Hydrolyse von der Enzymkonzentration

Um die Abhängigkeit der LG-Spaltung von der Enzymkonzentration zu untersuchen, wurde die Fermentaktivität im Standardansatz bei Zugabe verschiedener Homogenatkonzentrationen bestimmt. Die Inkubation betrug 45 bzw. 90 min bei 37° C. In Abb. 17 sind die Mittel-

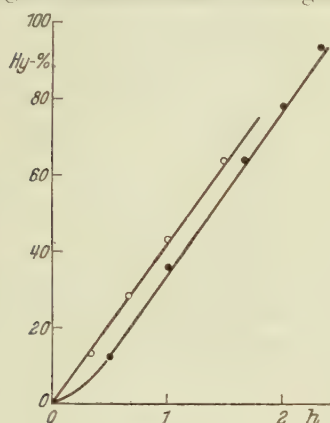


Abb. 16

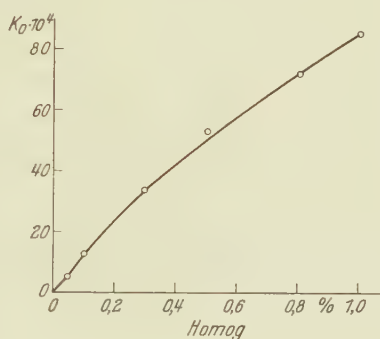


Abb. 17

Abb. 16. Zeitlicher Verlauf der l-Leucylglycin-Hydrolyse. Ordinate: Gespaltene Menge in Prozent der Ausgangsmenge. —○—○— Endometrium 625/56; —●—●— Endometrium 546/56. Abszisse: Zeit in Stunden. Standardansatz. Substratkonzentration 0,05 M. Gewebekonzentration 1 % Homogenat. 0,15 M Phosphatpuffer (nach SØRENSEN) pH 7,2. Inkubation bei 37°

Abb. 17. Abhängigkeit der l-Leucylglycin-Hydrolyse von der Enzymkonzentration (Endometrium 778/56). Ordinate: Reaktionskonstante K_0 . Abszisse: Homogenatkonzentration in Prozent. Standardansatz. Substratkonzentration 0,05 M. Gewebekonzentration variiert. 0,15 M Phosphatpuffer (nach SØRENSEN) pH 7,2. Inkubation 45 und 90 min, 37°

werte der Reaktionskonstanten K_0 für 45 bzw. 90 min graphisch dargestellt. Sie zeigt, daß die LG-Hydrolyse unter den gewählten Versuchsbedingungen annähernd proportional der Enzymkonzentration ist.

Einfluß von Aktivatoren bzw. Hemmstoffen auf die LG-Hydrolyse des Endometriums

Um den Einfluß verschiedener Substanzen auf die LG-Hydrolyse durch Endometriumhomogenat festzustellen, wurden Aktivatoren bzw. Hemmstoffe in der angegebenen Konzentration dem Standardansatz vor Versuchsbeginn zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37° C. Aus den Untersuchungen geht hervor, daß die LG-Hydrolyse des ungereinigten Endometriumhomogenats durch Mn^{II} nur in Anwesenheit von Veronalpuffer aktiviert, in Phosphatpuffer dagegen gehemmt wird. Co^{II} ist ohne Einfluß, desgleichen Zugabe von Na-Citrat. Durch Zn^{II} wird die

LG-Aminopeptidaseaktivität in geringem und in stärkerem Maße durch Cu^{II} und Ni^{II} gehemmt.

LG-Dipeptidaseaktivität im Endometrium verschiedener Cyclusphasen Gewählte Versuchsbedingungen

Aktivitätsbestimmungen 6–8 Std nach Materialentnahme. Standardansatz: 0,05 M Substratkonzentration. Gewebehomogenatkonzentration 1% = 0,010 g

Frischgewebe/ml Enzymlösung. 0,15 M Phosphatpuffer nach SØRENSEN, pH 7,2. Für die Bestimmung der Aktivität: Reaktionskonstante 0. Ordnung = K_0 . Proteolytischer Koeffizient = C_0 .

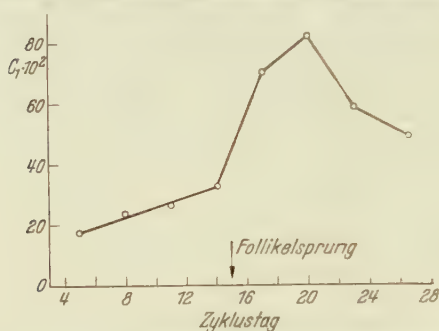


Abb. 18. 1-Leucylglycin-Dipeptidase-(Leucinamino-peptidase-)Aktivität des Endometriums während des Cyclus. Gruppenmittelwertskurve des proteolytischen Koeffizienten $\bar{C}_0$ für 3 bzw. 4 Cyclustage. Ordinate: Proteolytischer Koeffizient $\bar{C}_0$. Abszisse: Cyclustag

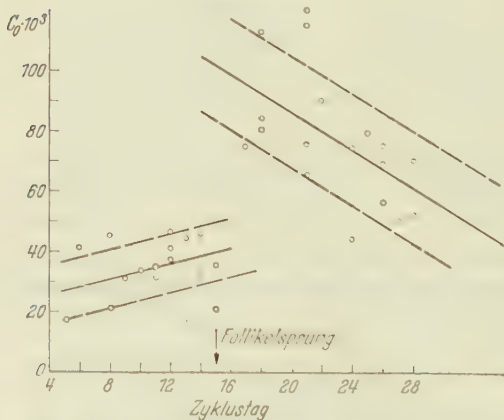


Abb. 19. 1-Leucylglycin-Dipeptidase-(Leucinamino-peptidase-)Aktivität im Endometrium während des Cyclus. Ordinate: Proteolytischer Koeffizient C_0 für jedes Endometrium. Abszisse: Cyclustag. Berechnete Regressionsgeraden mit Streubereich im Maßstab der Zeichnung

An 17 Endometrien der Proliferations- und 18 Endometrien der Sekretionsphase wurde die LG-Dipeptidaseaktivität bestimmt. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 9a und b zusammengefaßt. Die LG-Dipeptidaseaktivität ist in der Sekretionsphase $\bar{C}_0 = 7,74 \pm 0,504$ signifikant höher als in der Proliferationsphase ($\bar{C}_0 = 3,46 \pm 0,23$). Die Gruppenmittelwertskurve für $\bar{C}_0$ (Abb. 18) zeigt in der Proliferationsphase einen fast flachen Verlauf, in der frühen Sekretionsphase einen Gipfel, dann wieder einen Abfall gegen das Cyclusende zu. In Abb. 19 wurden die $\bar{C}_0$ -Einzelwerte gegen die Cyclustage aufgetragen und die Regressionsgeraden mit ihren Streubereichen eingezeichnet. Die Korrelation zwischen LG-Dipeptidaseaktivität und fortschreitenden Cyclustagen ist in der Proliferationsphase nicht zu sichern. In der Sekretionsphase besteht eine statistische Sicherheit von etwa 99%,

Die Korrelation zwischen LG-Dipeptidaseaktivität und fortschreitenden Cyclustagen ist in der Proliferationsphase nicht zu sichern. In der Sekretionsphase besteht eine statistische Sicherheit von etwa 99%,

Tabelle 9a. *LG-Dipeptidaseaktivität im Endometrium der Proliferationsphase*

Lfd. Nr.	Cyclustag	Prot.-Nr.	Ges.-N	I-Zeit min	Hy-%	$K_0 \cdot 10^4$	$C_0 \cdot 10^3$	$\bar{C}_0 \cdot 10^3$
1	5	792/56	0,234	45	18,0	40,0	1,71	1,68
				90	35,0	38,9	1,66	
2	6	1235/56	0,138	45	25,7	57,1	4,14	4,14
3	8	1062/56	0,135	45	12,4	27,5	2,04	2,07
				90	25,7	28,5	2,11	
4	8	541/56	0,143	45	29,0	64,4	4,50	4,50
				90	58,0	64,4	4,50	
5	9	846/56	0,169	45	24,4	54,2	3,21	3,11
				90	46,0	51,1	3,02	
7	10	850/56	0,187	45	27,8	61,8	3,30	3,37
				90	58,0	64,4	3,44	
8	11	931/56	0,216	45	33,0	73,3	3,39	3,13
				90	56,0	62,2	2,88	
9	11	976/56	0,159	45	24,0	53,3	3,35	3,59
				90	55,0	61,1	3,84	
10	11	793/56	0,147	45	25,0	55,5	3,77	3,61
				90	48,0	53,3	3,62	
12	12	902/56	0,144	45	24,0	53,3	3,70	3,77
				90	50,0	55,5	3,85	
13	12	773/56	0,169	45	36,0	80,0	4,73	4,66
				90	70,0	77,8	4,60	
14	12	1018/56	0,165	45	30,0	66,7	4,04	4,10
				90	62,0	68,9	4,17	
15	13	787/56	0,165	45	34,2	76,0	4,61	4,41
				90	65,0	72,2	4,37	
16	14	947/56	0,129	45	27,0	60,0	4,65	4,60
				90	53,0	58,9	4,56	
17	14	686/56	0,148	45	22,8	50,7	3,42	3,28
				90	42,0	46,7	3,15	
18	15	789/56	0,127	45	20,6	45,8	3,61	3,55
				90	40,0	44,4	3,50	
19	15	11/57	0,127	45	11,4	25,3	1,99	2,04
				90	24,0	26,7	2,10	

 $n = 17$.Mittelwert für $\bar{C}_0$ in der Proliferationsphase = 3,46. $s = \pm 0,98 \quad s_{C_0} = \pm 0,23$.Korrelationsrechnung 5.—15. Cyclustag gegen Spaltungswerte $\bar{C}_0$ ($n = 17$). $\bar{t} = 10,9 \quad \bar{C}_0 = 34,6 \quad s_{\bar{t}} = \pm 3,0 \quad s_{\bar{C}_0} = \pm 0,98$.Korrelationskoeffizient $r_{tc} = \pm 0,250$.Existenzprüfung der Korrelation: statistische Sicherheit $< 95\% < 2\sigma$.Streuungsgrenzen im Maßstab der Zeichnung = $\pm 9,5$.

etwa $2,6^\circ$, d. h. der abfallende Verlauf der Regressionsgeraden ist hier also sehr wahrscheinlich. Der Vergleich beider Korrelationskoeffizienten ergibt, daß der Anstieg der *LG-Dipeptidase-Aktivität während der Proliferation und der Abfall der Fermentaktivität während der Sekretionsphase statistisch als sehr wahrscheinlich* ($2,3\sigma$) anzusehen ist.

Tabelle 9b. *LG-Dipeptidaseaktivität im Endometrium der Sekretionsphase*

Lfd. Nr.	Cyclustag	Prot.-Nr.	Ges.-N	I-Zeit min	Hy. %	$K_1 \cdot 10^3$	$K_2 \cdot 10^3$	$C_0 \cdot 10^2$	$\bar{C}_0 \cdot 10^2$
2	17	781/56	0,131	45	46,0	102,0	97,6	7,79	7,45
				90	84,0	93,3		7,12	
3	18	790/56	0,116	45	45,0	100,0	93,3	8,62	8,04
				90	78,0	86,7		7,47	
4	18	88/57	0,112	45	46,6	103,0	94,7	9,20	8,41
				90	77,0	85,5		7,63	
5	18	733/57	0,141	60	95,6	159,0	159	11,3	11,3
6	21	1828/56	0,162	45	87,6	195,0	153	12,0	12,0
				90	100,0	111,0		(6,58)	
7	21	75/57	0,130	45	67,0	149,0	130	11,5	11,5
				90	100,0	111,0		(8,54)	
8	21	1350/56	0,157	45	54,0	120,0	103,3	7,64	6,58
				90	78,0	86,7		5,52	
9	21	362/57	0,207	30	69,0	230,0	198,5	11,1	7,58
				60	100,0	167,0		8,07	
10	22	860/57	0,202	45	82,0	182,0	182,0	9,01	9,01
11	24	991/56	0,144	45	31,0	68,9	64,4	4,78	4,47
				90	54,0	60,0		4,17	
12	24	432/57	0,154	30	30,5	102	114	6,62	7,43
				60	76,0	127		8,25	
13	25	845/56	0,148	45	58,0	129	117	8,72	7,90
				90	95,0	105		7,09	
14	26	699/56	0,141	45	54,0	120,0	106,6	8,51	7,56
				90	84,0	93,3		6,62	
15	26	942/56	0,152	45	49,5	110	106,0	7,24	6,97
				90	92,0	102		6,71	
16	26	1042/56	0,134	45	35,3	78,4	75,7	5,85	5,65
				90	65,7	73,0		5,45	
17	27	688/57	0,182	45	40,1	89,1	91,7	4,89	5,04
				90	85,0	94,4		5,19	
18	28	839/57	0,158	45	52,5	117	112	7,40	7,08
				90	96,0	107		6,77	
19	28	661/57	0,150	45	35,0	77,8	78,9	5,19	5,26
				90	72,0	80,0		5,33	

$n = 18$.

Mittelwert für $\bar{C}_0$ in der Sekretionsphase = 7,74.

$s = \pm 2,14$ $s\bar{C}_0 = \pm 0,504$.

Korrelationsrechnung 17. 28. Cyclustag gegen Spaltungswerte $\bar{C}_0$ ($n = 18$)

$\bar{t} = 22,8$ $\bar{C}_0 = 77,4$ $s_{\bar{t}} = + 3,64$ $s\bar{C}_0 = \pm 2,14$.

Korrelationskoeffizient $r_{tc} = -0,537$.

Existenzprüfung der Korrelation: statistische Sicherheit >95% beinahe 99% $\sim 2,6\sigma$; wahrscheinlich.

Streuungsgrenzen im Maßstab der Zeichnung = $\pm 18,06$.

Leucinaminopeptidaseaktivität in der Graviditätsdecidua

Bei den beiden untersuchten Fällen von Graviditätsdecidua war die Fermentaktivität im Gegensatz zu den anderen Peptidasen sehr

viel geringer als in der Sekretionsphase. Weitere Untersuchungen müßten zeigen, ob diese Ergebnisse zu sichern sind.

Leucinaminopeptidaseaktivität bei glandulär-cystischer Hyperplasie und Adenocarcinom

Bei 6 Untersuchungen an hyperplastischen Endometrien war die Fermentaktivität mit $\bar{C}_0 = 5.84 \pm 0.30$ signifikant höher als beim Endometrium der Proliferationsphase ($\bar{C}_0 = 3.46 \pm 0.238$). Auch beim Adenocarcinom scheint die Aktivität höher zu sein. Eine statistische Sicherung läßt sich dabei aber nicht durchführen.

Glycyl-L-Prolin (GP)-Dipeptidase (Prolidase)

Bereits 1932 wurde von BERGMANN u. Mitarb.^{3, 4} beobachtet, daß Extrakte aus Darmschleimhaut Peptide vom Typus des Glycyl-L-Prolins und Glycyl-L-oxyprolins hydrolysieren. Diese Wirkung ist nach BERGMANN und FRUTON 1936⁵ auf ein spezifisches Enzym zurückzuführen, da alle anderen bisher bekannten Fermente aus der Darmschleimhaut die eben erwähnten Substrate nicht spalten. Carbobenzoxylglycyl-L-prolin wird von diesem Enzym nicht hydrolysiert; dies wird als Beweis dafür aufgefaßt, daß eine freie Aminogruppe in der Nachbarschaft der Peptidbindung erforderlich ist⁶. Das Enzym wird dementsprechend als Dipeptidase klassifiziert, die für die Imino-peptidbindung von Prolin oder Oxyprolindipeptiden spezifisch ist. Es wird auch als Imino-peptidase bezeichnet.

Das p_H -Optimum liegt bei 7,7⁷. Das Enzym wird durch Mn^{II} aktiviert. Untersuchungen am Endometrium lagen bisher nicht vor. Für die Untersuchungen wurde als Substrat Glycyl-L-Prolin (GP) verwandt (Serva-Entwicklungslabor). Da nur eine geringe Menge des synthetischen Peptids zur Verfügung stand, mußten die Untersuchungen auf wenige Fälle beschränkt werden. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten im Standardansatz mit der Mikrotitration nach GRASSMANN und HEYDE²¹.

Zeitlicher Verlauf der Glycyl-L-Prolin-Hydrolyse

Um den zeitlichen Verlauf der GP-Hydrolyse des Endometriumhomogenats festzustellen, wurde die Enzymaktivität bei Endometrium 362/57

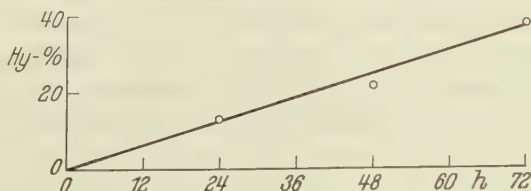


Abb. 20. Zeitlicher Verlauf der Glycyl-L-Prolin-Hydrolyse (Endometrium 362/57). Ordinate: Gespaltene Menge in Prozent der Ausgangsmenge. Abszisse: Zeit in Stunden. Standardansatz. Substratkonzentration 0,05 M. Gewebekonzentration 1 % Homogenat = 0,010 g Frischgewebe je ml Enzymlösung. 0,15 M Phosphatpuffer (nach SØRENSEN) p_H 7,2. 0,02 ml Toluol. Inkubation bei 37°

nach verschiedenen langen Inkubationszeiten (bis 72 Std) bestimmt. Dem Versuchsansatz wurde 1 Vol.-% Toluol beigegeben. In Abb. 20 sind die ermittelten prozentualen Spaltungswerte in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Aus der Abbildung geht hervor, daß die GP-Hydrolyse bis zu einer Spaltungszeit von 72 Std annähernd linear verläuft.

Prolidase-Aktivität des Endometriums in verschiedenen Cyclusphasen
Versuchsbedingungen

Aktivitätsbestimmungen 6–8 Std nach Materialentnahme. Standardansatz: 0,05 M Substratkonzentration. 0,15 M Phosphatpuffer nach SORENSEN, pH 7,2. Gewebekonzentration 1% = 0,010 g Frischgewebe ml Enzymlösung. Wegen der langen Inkubationszeit Leerversuche bis 72 Std. Prozentsatz der erhaltenen Spaltungsdifferenz zwischen Substratspaltung und Aciditätszuwachs der Autolyse (in der Tabelle K_0 , K_1 , C_0 , C_1).

An 4 Endometrien aus der Proliferations- bzw. Sekretionsphase wurde die Prolidaseaktivität bestimmt. Die Untersuchungsergebnisse sind in

Tabelle 10. *Prolidase-Aktivität im Endometrium*

I.f.d. Nr.	Cyclus- tag	Prot.- Nr.	Ges.-N	I-Zeit Std	Hy. %	$K_0 \cdot 10^4$	$C_0 \cdot 10^2$	$K_1 \cdot 10^4$	$\bar{C}_0 \cdot 10^2$
<i>Proliferationsphase</i>									
28	10	102 57	0,144	3 Std	4,5	2,5	0,174	1,18	0,082
				24 Std	13,3	0,92	0,064	0,421	0,021
19	15	11 57	0,127	14 Std	8,2	0,97	0,076	0,445	0,035
<i>Sekretionsphase</i>									
7	21	75/57	0,130	4 Std	19,1	10,6	0,815	5,19	0,399
				15 Std	31,8	3,42	0,263	1,80	0,138
				30 min					
9	21	362 57	0,207	24 Std	12,7	0,88	0,042	0,395	0,019
				48 Std	20,9	0,72	0,035	0,349	0,016
				72 Std	38,4	0,88	0,042	0,485	0,023

Tabelle 10 zusammengefaßt. Aus der Tabelle geht hervor, daß Glycyl-l-Prolin durch Endometriumhomogenat im Vergleich zu anderen Peptiden nur sehr langsam gespalten wird. Die stärkste Aktivität fand sich bei einem Endometrium der beginnenden Sekretionsphase (I.f.d. Nr. 7).

β -Alanly-l-histidin (AH)-Dipeptidase (Carnosinase)

Das β -Alanly-l-histidin spaltende Ferment Carnosinase konnte in tierischen Gewebsarten erstmalig von GARKOVI¹⁸ 1937 nachgewiesen werden. Es wurde von HANSON und SMITH²⁷ teilweise gereinigt und näher charakterisiert. Carnosin wird zu β -Alanin und l-Histidin aufgespalten. Das Enzym (aus Schweinenieren isoliert) wird durch Metallgifte wie Cyanid und Sulfid gehemmt und durch Zn^{II} und Mn^{II} aktiviert. Das p_H -Optimum liegt in Anwesenheit von Zn^{II} bei 7,8–7,9; das durch

Mn^{II} aktivierte Enzym wirkt optimal bei p_H 8,0–8,4. In Abwesenheit von Metallionen wird Carnosin am stärksten bei p_H 7,4–7,5 gespalten¹⁸. Es muß als sicher angesehen werden, daß die Carnosinase mit keinem anderen bisher bekannten Typ der Exopeptidasen identisch ist^{29a*}. Als Substrat für die Untersuchungen wurde β -Alanyl-L-Histidin (Firma Roche) verwandt. Die Bestimmung der AH-Hydrolyse wurde im Standardansatz mit der Mikrotitration nach GRASSMANN und HEYDE²¹ durchgeführt. Wegen der geringen Menge des zur Verfügung stehenden synthetischen Peptids konnte nur eine beschränkte Anzahl von Aktivitätsbestimmungen durchgeführt werden.

Carnosinaseaktivität im Endometrium

Gewählte Versuchsbedingungen wie bei Glycyl-L-Tryptophan. In den drei untersuchten Endometriumhomogenaten (Tabelle 11) konnte eine gewisse Carnosinaseaktivität festgestellt werden. Während des Endometrium (Nr. 4) der Proliferationsphase bei 60 min Inkubationszeit 12% des Substrates gespalten hatte, wurde bei der Graviditätsdecidua erst nach 230 min Inkubationszeit eine 15%ige Spaltung nachgewiesen. Der Vergleich dieser Werte sowie der berechneten Werte von K_0 , K_1 , C_0 und C_1 zeigt deutlich, daß das Endometrium der Proliferationsphase eine höhere Fermentaktivität besitzt.

Glycyl-L-Tryptophan(GT)-Hydrolyse

Glycyl-L-Tryptophan wurde 1909 von NEUBAUER und FISCHER⁵³ zur Aktivitätsbestimmung von Gewebepeptidasen empfohlen. GRASSMANN und HEYDE²³ konnten 1930 feststellen, daß Glycyl-L-Tryptophan durch Serum gespalten wird. Untersuchungen darüber, ob Glycyl-L-Tryptophan durch eine spezifische Peptidase gespalten wird, liegen nicht vor^{**}. Wir verwandten für die Untersuchungen Glycyl-L-Tryptophan (Firma Roche).

GT-Hydrolyse durch Endometriumhomogenat

Gewählte Versuchsbedingungen. Aktivitätsbestimmungen 6–8 Std nach Materialentnahme. Standardansatz; 0,05 M Substratkonzentration, 0,15 M Phosphatpuffer nach SORESENSEN, p_H 7,6. Gewebhomogenat 1% = 0,010 g Frischgewebe/ml Enzymlösung. Für die Aktivitätsbestimmungen berechnet: K_0 , C_0 , K_1 , C_1 .

An 4 Endometrien der Proliferations- und 4 der Sekretionsphase, einem Endometrium mit einer glandulär-cystischen Hyperplasie und 2 Fällen von Graviditätsdecidua wurde die GT-Hydrolyse bestimmt. Da keine reaktionskinetischen Untersuchungen durchgeführt wurden, sind in Tabelle 11 K_0 , K_1 , C_0 und C_1 angegeben.

* Untersuchungen am Endometrium lagen bisher noch nicht vor.

** Über die Glycyl-L-Tryptophanspaltung durch Endometrium ist uns nichts bekannt.

Das Endometrium der Sekretionsphase scheint auch gegenüber dem Substrat wie bei allen anderen Substraten fermentaktiver als in der Proliferationsphase zu sein. Die C_1 -Werte bzw. C_0 -Werte sind in der Sekretionsphase deutlich höher als in der Proliferationsphase.

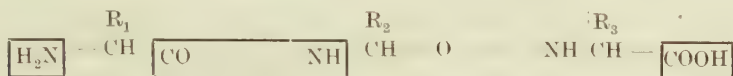
Amino-Tripeptidase

Schon frühzeitig wurde erkannt, daß Dipeptide und Tripeptide von verschiedenen Fermenten hydrolysiert werden^{20, 88}. Für die Wirksamkeit der Aminotripeptidase ist eine freie Aminogruppe am Substrat erforderlich, denn Acetylierung der Aminogruppe verhindert die Spaltung. Die gereinigte Aminotripeptidase spaltet Dipeptide nur sehr gering. Während die Dipeptidspaltung allgemein durch Metallionen aktiviert

Tabelle 11. *Carnosinaseaktivität im Endometrium*

Lfd. Nr.	Prot.- Nr.	Ges.-N	I-Zeit min	Hy- %	$K_a \cdot 10^4$	$C_0 \cdot 10^2$	$K_s \cdot 10^4$	$C_1 \cdot 10^2$	$\bar{C}_1 \cdot 10^2$
Proliferation									
4	514/57	0,143	60	12,0	20,0	14,0	9,417	0,6585	0,658
19	11/57	0,127	60	8,0	13,3	10,2	6,29	0,495	0,466
			120	16,0	13,3	10,2	5,56	0,437	
Decidua									
1	633/57	0,112	230	15,2	6,61	5,90	3,126	0,2791	0,279
Glycyl-l-Tryptophan-Hydrolyse durch Endometriumhomogenat									
Proliferation									
4	541/57	0,143	60	55,2	92,0	6,43	58,0	4,05	4,05
19	11/57	0,127	45	19,3	42,9	3,38	20,7	1,63	1,25
			90	21,0	23,3	1,83	11,1	0,87	
2	1235/56	0,138	45	32,4	72,0	5,22	37,8	2,74	2,83
			90	56,8	63,1	4,57	40,4	2,93	
3	1062/56	0,138	45	22,6	50,2	3,64	24,6	1,78	1,75
			90	39,2	43,5	3,15	23,9	1,73	
									M = 2,67
Hyperplasie									
1	687/57	0,182	30	57,2	190,7	10,78	123,1	6,76	6,76
Sekretion									
12	432/57	0,154	40	77,2	193,0	12,53	160,0	10,40	10,4
9	362/57	0,207	30	88,6	295,3	14,26	314,0	15,20	15,2
4	88/57	0,112	45	50,4	112,0	10,00	67,9	6,06	6,95
			90	83,8	93,1	8,31	87,8	7,84	
7	75/57	0,130	45	78,0	173,9	13,33	146,0	11,20	10,36
			90	92,3	102,5	7,88	123,8	9,52	
									M = 10,70
Decidua									
20	633/57	0,112	30	49,5	165,0	14,73	98,9	8,83	9,05
			60	76,2	127,0	11,33	104,0	9,28	
21	369/57	0,132	30	36,2	120,7	9,14	65,3	4,95	4,95

wird, wird die Hydrolyse der Tripeptide durch Metallionen nicht gesteigert^{16, 71}. Nach Untersuchungen von FRUTON¹⁶ mit einer gereinigten Präparation aus Kalbsthymus muß das Substrat einer Aminotripeptidase folgende Struktur besitzen:



Die unrandeten Gruppen sind für die Spaltbarkeit eines Tripeptids unbedingt erforderlich. R₁ und R₂ müssen Wasserstoff, der Methylrest von β-Alanin oder der (CH₃) -CH-CH₂-Rest von l-Leucin sein, während die dritte Aminosäure Glycin, l-Leucin oder auch l-Prolin sein kann. Die optische Spezifität von R₁ und R₂ kann durch die völlige Unspaltbarkeit von d-Leucylglycylglycin und Glycyl-d-leucylglycin gezeigt werden.

Nach Untersuchungen von FRUTON u.a.¹⁶ an einer gereinigten Enzympräparation aus Kalbsthymus folgt die Spaltung der Tripeptide („Lymphopeptidase“) über weite Bereiche der 0. Ordnungsreaktion. Das p_H-Optimum liegt bei p_H 8,0. In schwach saurem Milieu wird das Enzym schnell zerstört.

Zur Bestimmung der Aminotripeptidaseaktivität wurden als Substrate l-Leucylglycylglycin (LGG) und Glycylglycylglycin (GGG) (Firma Roche) verwendet in 0,05 M Substratkonzentration. Die Untersuchungen erfolgten im Standardansatz. Die Bestimmung der abgespaltenen Aminosäuren erfolgte mit der Mikrotitration nach GRASSMANN und HEYDE²¹.

Glycylglycylglycin (GGG)-Hydrolyse

Zeitlicher Verlauf der GGG-Spaltung

Um den zeitlichen Verlauf der GGG-Hydrolyse festzustellen, wurde das Substrat mit 1% Endometriumhomogenat (End. 75/57) unter Stan-

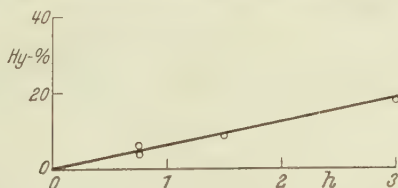


Abb. 21. Zeitlicher Verlauf der Glycylglycylglycin-Hydrolyse. Endometrium 543/57. Ordinate: Gespaltene Menge (Hy-%) in Prozent der Ausgangsmenge. Abszisse: Zeit in Stunden. Standardansatz. Substratkonzentration 0,05 M. Gewebekonzentration 1% Homogenat. 0,15 M Phosphatpuffer (nach SØRENSEN), p_H 7,2. Inkubation bei 37°

dardbedingungen bei 37° C bis zu 3 Std inkubiert. Das Ergebnis ist in Abb. 21 dargestellt. Aus der Abbildung geht hervor, daß die Spaltung der GGG im untersuchten Zeitraum bis 180 min unter den gewählten Versuchsbedingungen linear verläuft.

*GGG-Hydrolyse**Aktivierung und Hemmung*

Um festzustellen, ob die GGG-Tripeptidase durch Co^{II} oder Mn^{II} beeinflusst wird, wurden dem Versuchsansatz in 0,04 M Veronalpuffer pH 8,0 Co^{II} und Mn^{II} in der angegebenen Konzentration zugegeben. Aus den Untersuchungen geht hervor, daß die GGG-Hydrolyse durch Endometriumhomogenat unter den gewählten Versuchsbedingungen durch Co^{II} oder Mn^{II} nicht beeinflusst wird.

GGG-Hydrolyse durch Endometrium

Gewählte Versuchsbedingungen. Aktivitätsbestimmungen 6—8 Std nach Materialentnahme. Standardansatz; Substratkonzentration 0,05 M. Gewebekonzen-

Tabelle 12. *GGG-Hydrolyse durch Endometrium*

Lfd. Nr.	Prot.-Nr.	Ges.-N	I-Zeit min	Hy. %	$K_s \cdot 10^4$	$C_s \cdot 10^2$	$\bar{C}_s \cdot 10^2$
<i>Proliferation</i>							
4	541/57	0,143	90	6,0	6,67	0,466	0,474
			180	12,4	6,89	0,482	
19	11/57	0,127	90	4,0	4,44	0,350	0,350
			180	8,0	4,44	0,350	
28	102,57	0,144	90	0,0	0,0	0,0	0,069
			180	3,6	2,00	0,139	
							$M = 0,298$
<i>Sekretion</i>							
4	88/57	0,112	90	8,5	9,44	0,843	0,866
			180	19,0	10,06	0,898	
5	733/57	0,141	90	6,0	6,67	0,473	0,493
			180	13,0	7,22	0,512	
7	75/57	0,130	45	4,0	8,89	0,684	0,709
			90	8,1	9,00	0,692	
			180	17,6	9,78	0,752	
9	362/57	0,207	90	14,8	16,45	0,795	0,746
			180	26,0	14,44	0,698	
34	365/57	0,150	90	8,5	9,44	0,629	0,647
			180	18,0	10,00	0,666	
							$M = 0,692$
<i>Decidua</i>							
1	633/57	0,112	90	7,0	7,78	0,695	0,725
			180	15,2	8,44	0,754	
2	369/57	0,132	90	6,0	6,67	0,505	0,509
			180	12,4	6,89	0,512	
							$M = 0,617$
<i>Hyperplasie</i>							
1	687/57	0,182	90	13,0	1,44	0,791	0,797
			180	26,2	1,46	0,802	
7	370/57	0,142	90	7,0	7,78	0,548	0,587
			180	16,0	8,89	0,626	
							$M = 0,692$

tration 1% = 0,10 g Frischgewebe je ml Enzymlösung, 0,15 M Phosphatpuffer nach SORENSEN; p_H 7,2. Für die Bestimmung der Aktivität errechnet = K_0 , proteolytischer Koeffizient = C_0 .

Wegen der nur zur Verfügung stehenden geringen Menge des Substrates mußte die Zahl der Untersuchungen beschränkt werden. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefaßt. Bei allen untersuchten Endometrien der Sekretionsphase war die Fermentaktivität wesentlich höher als in der Proliferationsphase. Die Aktivität in der Graviditätsdecidua und bei der glandulär-cystischen Hyperplasie entspricht etwa der der Sekretionsphase.

L-Leucylglycylglycin-Hydrolyse

Zeitlicher Verlauf der L-Leucylglycylglycin (LGG)-Spaltung

Um den zeitlichen Verlauf der LGG-Hydrolyse festzustellen, wurde das Substrat mit 1% Endometriumhomogenat verschieden lange inkubiert. Die ermittelten prozentualen Spaltungswerte der ersten 3 Std sind in Abb. 1 gegen die Zeit aufgetragen. Aus der Abbildung geht hervor, daß die LGG-Hydrolyse des Endometriums in den ersten 3 Std annähernd linear verläuft.

Aktivierung und Hemmung der LGG-Spaltung

In einer Versuchsreihe wurde der Einfluß von verschiedenen Substanzen auf die LGG-Hydrolyse durch Endometriumhomogenat festgestellt. Die Aktivitätsbestimmung wurde im Standardansatz in Veronalpuffer (0,04 M) p_H 8,0 durchgeführt. Die Substanzen wurden in der angegebenen Konzentration zugegeben. Aus den Untersuchungen geht hervor, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen die LGG-Hydrolyse durch Endometriumhomogenat durch Anwesenheit von Mn^{II} in einer Konzentration von 0,001 M aktiviert wird. Durch Mg^{II} und Na-Citrat bleibt die LGG-Spaltung unbeeinflusst.

LGG-Hydrolyse des Endometriums

Gewählte Versuchsbedingungen wie bei Glycylglycylglycin-Hydrolyse. Mit LGG als Substrat wurde an 3 Endometrien der Proliferationsphase, 5 Endometrien der Sekretionsphase, 2 Fällen von Graviditätsdecidua und an 2 Endometrien mit den histologischen Zeichen der glandulär-cystischen Schleimhauthyperplasie die Aminotripeptidaseaktivität bestimmt. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengestellt. Soweit man bei der kleinen Zahl beurteilen kann, scheint die Aminotripeptidaseaktivität im Endometrium der Sekretionsphase höher zu sein (C_0 Mittel = 1,09) als im proliferierenden Endometrium (C_0 Mittel = 0,53). In der Graviditätsdecidua war bei einer Bestimmung die Aktivität im III. Monat (lfd. Nr. 1) höher als in einer Decidua vom IV. Monat. Der Koeffizient (C_0) für die Hyperplasie lag bei 2 Bestimmungen über dem

Tabelle 13. *LGG-Hydrolyse durch Endometrium*

Lfd. Nr.	Prot.-Nr.	Ges.-N	I-Zeit min	Hy. %	$K_0 \cdot 10^4$	$C_0 \cdot 10^2$	$\bar{C}_0 \cdot 10^2$
Proliferation							
4	541/57	0,143	90	7,3	8,11	0,567	0,602
			180	16,4	9,11	0,637	
19	11/57	0,127	45	3,0	6,67	0,525	0,525
			90	6,0	6,67	0,525	
28	102/57	0,144	90	6,0	6,67	0,463	0,463
			180	12,0	6,67	0,463	
$M = 0,530$							
Sekretion							
4	88/57	0,112	90	12,0	13,3	1,19	1,22
			180	25,3	14,0	1,25	
5	733/57	0,141	90	10,0	11,1	0,787	0,787
			180	20,0	11,1	0,787	
7	75/57	0,130	90	17,0	18,9	1,45	1,49
			180	36,6	20,0	1,54	
9	362/57	0,207	90	18,0	20,0	0,966	0,939
			180	34,0	18,9	0,913	
34	365/57	0,150	90	14,0	15,5	1,03	1,03
			180	28,0	15,5	1,03	
$M = 1,09$							
Decidua							
1	633/57	0,112	90	12,0	13,3	1,19	1,22
			180	25,2	14,0	1,25	
2	6369/57	0,132	90	7,5	8,33	0,631	0,631
			180	15,0	8,33	0,631	
$M = 0,925$							
Hyperplasie							
1	687/57	0,182	90	16,0	17,8	0,978	0,991
			180	33,0	18,3	1,005	
7	370/57	0,142	90	10,5	11,7	0,824	0,824
			180	21,0	11,7	0,824	
$M = 0,907$							

Mittel der Proliferationsphase. Bei der geringen Anzahl der Untersuchungen ist aber keine sichere Aussage möglich.

Diskussion

In vorliegender Arbeit wird gezeigt, daß im Endometrium und in anderen Geweben der weiblichen Genitalorgane eine Reihe spezifischer Exopeptidaseaktivitäten vorkommen.

Die Versuchsergebnisse berechtigen zu der Schlußfolgerung, daß das früher in Endometrium und Placenta beschriebene „Erepsin“, welches von FRANKL und ASCHNER¹⁵ dem Trypsin gleichgesetzt wurde, ein Fermentgemisch mit sehr verschiedener Spezifität darstellt.

Zu den reaktionskinetischen Untersuchungen

Glycyl-l-Leucin wird unter den gleichen Versuchsbedingungen von allen untersuchten Substraten am schnellsten hydrolysiert. Das geht aus Tabelle 14 hervor, in der zum Vergleich die verschiedenen proteolytischen Koeffizienten des Endometriums der Proliferation (C_1 bzw. C_0

Tabelle 14. Spaltung verschiedener Substrate durch ungereinigten Endometriumextrakt (Endometrium der Proliferationsphase) ($\bar{C}_{1GL} = 100\%$)

Substrat	C_1 %	Substrat	C_0 %
Glycyl-l-leucin	100,00	l-Leucylglycin	14,00
dl-Alanylglycin	49,40	l-Leucylglycylglycin . . .	2,15
Glycyl-l-tryptophan	10,80	Glycylglycylglycin . . .	1,21
β -Alanyl-l-histidin	2,69		
Glycylglycin	2,38		
Glycyl-l-prolin	0,29		

dargestellt sind. Dabei wurde der Koeffizient C_1 der GL-Spaltung = 100% gesetzt. Aus der schnellen Spaltung des GL kann man den Schluß ziehen, daß die GL-Dipeptidase unter den gewählten Versuchsbedingungen eine große Aktivität besitzt. Es kann nicht entschieden werden, ob die Wirksamkeit der GL-Dipeptidase besonders günstigen Versuchsbedingungen zuzuschreiben ist, oder ob das Endometrium eine besonders hohe GL-Dipeptidaseaktivität besitzt.

An anderen Organen hat sich ein ganz anderes Wirkungsspektrum der Peptidasen ergeben. So fand WEISS⁸⁹ z.B. bei Untersuchungen an der Schilddrüse, daß dl-Alanylglycin am schnellsten hydrolysiert wird. Nach Untersuchungen von SMITH und BERGMANN⁷¹ wird l-Alanylglycin durch Extrakte der Darmschleimhaut schneller gespalten als irgendeine andere Substanz. SMITH⁷³ gibt an der Rattenmuskulatur und Uterusmuskulatur ein von unseren Ergebnissen abweichendes Verhältnis zwischen Di- und Tripeptidaseaktivität an. ENGEL und SCHWARTZ¹² fanden in allen untersuchten Tierorganen ein sehr unterschiedliches Verhalten der GG-, LGG- und GGG-Peptidaseaktivität. Es erscheint durchaus möglich, daß in jedem Organ ein anderes und ganz spezifisches Wirkungsspektrum der Peptidaseaktivität besteht.

Die Aktivität und das reaktionskinetische Verhalten hängen bei allen Peptidasen weitgehend von der Reinigung und der Anwesenheit aktivierender Metalle ab⁷⁹. Die Fermentaktivität im Endometrium erwies sich im allgemeinen als ziemlich stabil. Insbesondere scheint die GG-Dipeptidase des Endometriums viel stabiler zu sein als die GG-Dipeptidase der Rattenmuskulatur⁷⁴, deren Aktivität in 12 Std auf über 50% absinkt.

Die p_H -Wirkungskurven der ungereinigten Endometrium-Dipeptidasen zeigten gewisse Unterschiede, das p_H -Optimum liegt im all-

gemeinen im schwach alkalischen Bereich. Da die optimale Wasserstoffionenkonzentration einer Fermentreaktion von vielen Faktoren abhängig ist, lassen sich die am Endometrium gewonnenen Ergebnisse über das p_H -Optimum der Dipeptidasewirkung nicht ohne weiteres mit anderen Versuchsergebnissen hinichtlich des p_H -Wertes vergleichen. Trotzdem besteht eine gewisse Übereinstimmung. So z. B. stimmt das Wirkungsoptimum der GG-Dipeptidase des Endometriums annähernd mit dem Wirkungsoptimum der GG-Dipeptidase der Uterusmuskulatur⁷⁴ überein. Das p_H -Optimum der Darm-GG-Dipeptidase liegt bei 7.8⁸⁷.

Bei der Leucinaminopeptidase bildet sich im Endometrium ab p_H 7.0 ein Plateau aus; eine ähnliche p_H -Wirkungskurve wird von WEISS⁸⁰ für die ungereinigte K-Amino-peptidase der Schilddrüse angegeben. Bei stark gereinigten Enzymlösungen scheint das p_H -Wirkungsoptimum der Exopeptidaseaktivität weiter im alkalischen Bereich zu liegen, so z. B. in der Darmmucosa zwischen p_H 8.0 und 9.0^{34, 71}. Eine stark gereinigte Leucinaminopeptidase hatte bei Aktivierung durch Mn eine optimale Aktivität um p_H 9.1 und bei Mg^{II} -Aktivierung um p_H 9.3⁸⁰.

Auch der zeitliche Umsatz hängt weitgehend von der Reinheit der Enzympräparation und den gewählten Versuchsbedingungen ab. In Übereinstimmung mit SMITH⁷⁹ wurde festgestellt, daß die GL-Hydrolyse in erster Annäherung einer 1. Ordnungsreaktion folgt, die nach SMITH⁷⁹ nur bei Anwesenheit aktivierender Metallionen und Phosphatpuffer erreicht wird. Am Endometrium erfolgte durch Zugabe von Mn^{II} unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Aktivierung, sondern eine Hemmung. Die Ursache für diese Hemmung dürfte vielleicht in der Überschreitung der optimalen, zur Aktivierung notwendigen Mn-Konzentration zu suchen sein. Im Gegensatz zu SMITH⁷⁹ wurde festgestellt, daß die GL-Hydrolyse der Uterusmuskulatur unter den gewählten Versuchsbedingungen durch Zn^{II} gehemmt wird. Während bei anderen Geweben (Uterusmuskel, Rattenmuskel⁷⁴), Zwerchfellmuskel⁶⁹, die Spaltung mehr nach der 0. Ordnung verläuft, folgte die Spaltung von GG durch ungereinigtes Endometriumhomogenat mehr der 1. Ordnungsreaktion. Die Aktivität der GG-Dipeptidase des Endometriums wird durch Co^{II} (0.001M) um etwa das 4fache gesteigert. Nach SMITH⁷⁴ bewirkt Co^{II} eine etwa 10fache Aktivitätssteigerung der GG-Dipeptidase der Uterusmuskulatur. Auch von zahlreichen anderen Untersuchern^{45, 49, 69, 80} wurde eine Co-Aktivierung der GG-Dipeptidase beobachtet. Co^{II} kann durch Mn^{II} teilweise ersetzt werden, wie die Aktivierung der GG-Hydrolyse durch Endometrium nach Zugabe von Mn^{II} zeigt.

Der zeitliche Verlauf der dl-Alanyl-glycin-Hydrolyse durch Endometriumhomogenat, der nur in der Anfangszeit einer 1. Ordnungsreaktion folgte, entsprach insofern den Erwartungen, als nach GRASSMANN²² die nach MICHAELIS ermittelte Affinität zum Substrat in der Reihe

Leucylglycin-Alanylglycin-Glycylglycin abfällt und in der gleichen Reihenfolge eine Änderung der Kinetik vom linearen zu mehr oder weniger gekrümmten Reaktionsverläufen auftritt. Die Tatsache, daß alle zugefügten Metalle die ungereinigte Enzympräparation hemmten, deutet daraufhin, daß bereits optimale Aktivierung vorliegt.

Die Spaltung des LG erfolgte bis zur fast völligen Aufspaltung im wesentlichen einer 0. Ordnungsreaktion.

Nach SMITH und SPACKMAN⁸⁰ hängen die Zeitumsatzkurven der Leucinaminopeptidase von der Mn^{II} - oder Mg^{II} -Zugabe ab. Diese Autoren fanden, daß sie bei Mg -Aktivierung mehr einer 0. Ordnung, bei Mn -Zugabe mehr einer 1. Ordnung entsprachen. Bei der LG-Hydrolyse des Endometriumhomogenat fand sich des öfteren im Beginn des Versuches ein zunächst flacher und dann erst ein linearer Kurvenverlauf (Abb. 16). Dieses Phänomen beruht nach SMITH und SPACKMAN⁸⁰ darauf, daß nicht von Anfang an volle Aktivierung vorhanden ist. Nach SMITH und BERGMANN^{70, 71} ist die Aktivierung des Proteins (Enzym) bei der Leucinaminopeptidase mit Mn^{II} ein langsamer Prozeß, im Gegensatz zu der Aktivierung der Glycylglycin-Dipeptidase durch Co . Ähnliches konnte bei der Arginase und Phosphatase^{32, 62} beobachtet werden. Kurz vor der vollständigen Aufspaltung des l-Leucylglycins scheint sich der Kurvenverlauf wieder zu krümmen, wie es schon von LINDERSTRÖM-LANG^{41, 42} an der Darmschleimhaut festgestellt wurde. Mn^{II} -Zugabe hemmte in Phosphatpuffer die ungereinigte Enzympräparation des Endometriums, während bei Veronalpuffer eine Aktivierung eintrat.

In Übereinstimmung mit der Literatur^{16, 88} wurde festgestellt, daß die Spaltung der Tripeptide GGG und LGG über weite Bereiche einer Reaktion 0. Ordnung folgt. Die GGG-Hydrolyse durch Endometrium und Muskulatur wird unter den gewählten Versuchsbedingungen durch Co^{II} - und Mn^{II} -Zugabe nicht beeinflusst.

Diese fehlende Initialaktivierung spricht für das Vorhandensein einer Tripeptidase, denn nach SMITH⁷³ wird erst die Spaltung der zweiten Peptidbindung, die durch die Mitwirkung der GG-Dipeptidase zustande kommt, durch Co^{II} und Mn^{II} aktiviert. Es konnte beobachtet werden, daß die LGG-Hydrolyse durch Endometrium- und Muskelhomogenat durch Mn^{II} -Zugabe unter den gewählten Versuchsbedingungen aktiviert wird. Dieses Verhalten spricht dafür, daß LGG nicht nur durch eine Tripeptidase gespalten wird, sondern daß hierbei eine Mn -aktivierbare Leucinamino-Peptidase mitwirkt. In der Uterusmuskulatur fand SMITH⁷³ unter anderen Versuchsbedingungen keine Mn^{II} -Aktivierung der LGG-Hydrolyse. Er vermutete, daß die Spaltung von LGG durch eine Tripeptidase zu schnell ist, um durch die vorhandene Leucinaminopeptidase beeinflusst zu werden.

Zu den Aktivitätsbestimmungen an Endometrium

Das Verhalten der GG-, GL-, AG- und LG-Dipeptidase während des Cyclus wurde besonders untersucht. Wie bei allen Untersuchungen am biologischen Material war mit einer gewissen Schwankungsbreite zu rechnen. Diese ist wohl weniger der Methodik zuzuschreiben, als vielmehr durch das zur Verfügung stehende, nicht völlig homogene Ausgangsmaterial bedingt. Obwohl aus einer großen Untersuchungsreihe nur die Fälle ausgewählt wurden, bei denen nach der histologischen Untersuchung am Endometrium keine pathologischen Veränderungen am Endometrium erkennbar waren, lassen sich doch andere, histologisch nicht erkennbare Störungen durch Veränderungen der inneren Sekretion nicht ausschließen. Auch scheint eine Beziehung zwischen Lebensalter und Enzymaktivität zu bestehen⁴⁰. So nimmt z. B. die Aktivität der Cytochromoxydase im Uterus der Ratte mit zunehmendem Alter ab⁶⁵. Es stand vorwiegend Endometrium von älteren Frauen zur Verfügung. Eine weitere Fehlerquelle bietet die Einordnung nach dem Cyclustag, mit dem das histologische Bild nicht immer übereinstimmt. So tritt z. B. bei Frauen mit 24tägigem Cyclus bereits am 22. und 23. Tag die prämenstruelle Schrumpfung auf, während bei Frauen mit 30tägigem Cyclus zu diesem Zeitpunkt im Endometrium erst der Beginn der Sekretion stattfindet.

Trotz der Schwankungsbreite hat sich ein statistisch gesicherter Anstieg der GG-, GL-, AG- und LG-Dipeptidaseaktivität in der Sekretionsphase ergeben. Auch das Substrat Glycyl-L-Tryptophan und die Tripeptide GGG und LGG scheinen durch Homogenate von sezernierenden Endometrien schneller hydrolysiert zu werden. Mit Hilfe der Korrelationsrechnung konnte gezeigt werden, daß die Exopeptidaseaktivität im Endometrium in der Proliferationsphase bis etwa zum 15. Tag langsam ansteigt, daß die höchste Aktivität im Beginn der Sekretionsphase erreicht wird, und daß die Aktivität bereits vor der Menstruation wieder abzufallen beginnt. Dieses Verhalten läßt sich bei der GL-Dipeptidase statistisch sichern, bei der AG- und LG-Dipeptidase ist es bei Anlegung strengster Maßstäbe statistisch wahrscheinlich (zwischen 2 und 3 σ Grenze), d. h. die Beobachtungen sind mit der Hypothese zu vereinbaren³⁷. Die Änderung der Peptidaseaktivität im Endometrium während des Cyclus ist schematisch in Abb. 22 dargestellt. Hier ist in das Schema (Abb. 22) von OBER^{55, 56} mit den morphologischen und hormonellen Veränderungen die Mittelwertskurve (in Prozent) der GL-, GG-, AG- und LG-Dipeptidaseaktivität eingezeichnet, wobei die Aktivität im Beginn des Cyclus = 100% gesetzt wurde.

Zum Vergleich der Fermentaktivität mit dem histologischen Bild

Bei keinem Organ ist wohl die Beziehung zwischen Struktur und Funktion so deutlich ausgeprägt wie am Endometrium, und die Uterus-

schleimhaut gilt mit Recht als Spiegel der Ovarialfunktion. Am Endometrium laufen sehr charakteristische morphologische Veränderungen ab, die weitgehend bekannt sind. Im Endometrium steht in der Proliferationsphase das Zellwachstum mit reger Zellteilung im Vordergrund, gekennzeichnet durch den hohen Ribonucleinsäuregehalt, einen fort-

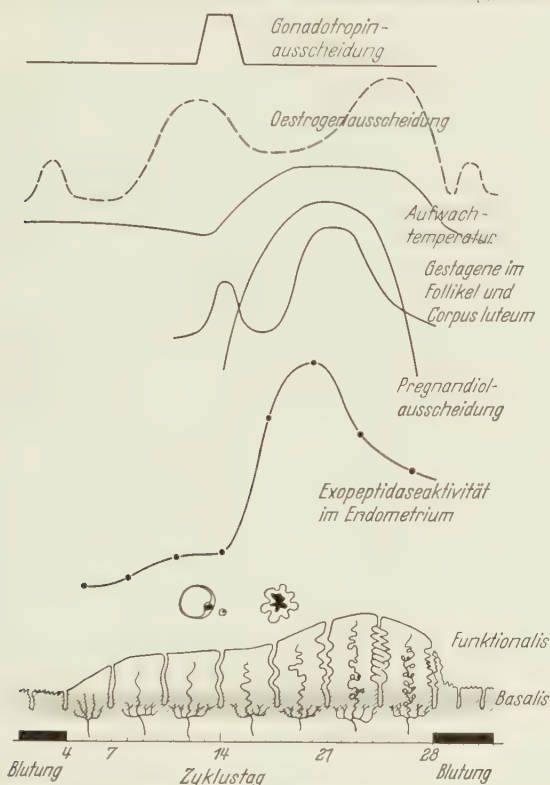


Abb. 22. Schematische Abbildung. Exopeptidaseaktivität in Prozent, Aktivität am Cyclusanfang = 100 % gesetzt. Hormonausscheidungskurven nach OBER⁶⁶, Gestagene in Follikel und Gelbkörper nach ZANDER⁹¹

schreitenden Aktivitätsanstieg der alkalischen Phosphatase (Übersicht s. bei RUNGE und EBNER⁶⁶), sowie durch ein gleichzeitiges Auftreten metachromatischer Substanzen im Stroma.

Das langsame Ansteigen der Exopeptidaseaktivität im Endometrium während der Proliferation kann mit dem zunehmenden Wachstum der Schleimhaut in Verbindung gebracht werden. Auf einen Aktivitätsanstieg der eiweißspaltenden Fermente beim Wachstum wurde in der Literatur hingewiesen. NORBERG⁵⁴ schrieb die Aktivitätszunahme des Kathepsins und der Dipeptidase bei der Regeneration einer partiell ektomierten Rattenleber der gesteigerten Proteinsynthese zu und vermutete synthetische Funktionen der Peptidasen. ORCHOWITSCH⁵⁷

konnte eine Zunahme der Peptidaseaktivität im regenerierenden Gewebe von Amphibien nachweisen. BROOMLEY und ORCHOWITSCH⁵ fanden in regenerierenden Geweben eine stärkere Autolyse als in stationären Geweben und vermuteten eine größere Aktivität der Gewebsproteasen. MATHIES, PALM u.a.⁵⁰ stellten eine Zunahme der Kathepsinaktivität in allen Organen bei hypophysektomierten Tieren nach Gaben von Wachstumshormon fest.

In der Proliferationsphase unterliegt das Endometrium nach unseren heutigen Vorstellungen zunächst dem Oestrogeneinfluß. Der allmähliche Anstieg der Exopeptidaseaktivität in der ersten Cyclushälfte, der zeitlich mit der zunehmenden Oestrogenwirkung zusammenfällt (Abb. 22), deutet daraufhin, daß die Fermentaktivität im Endometrium durch Oestrogene beeinflußt wird. Ob die das Wachstum des Endometriums stimulierenden Oestrogene direkt die Aktivität der Peptidasen im Gewebe steigern oder ob der Anstieg der Fermentaktivität nur Ausdruck des fortschreitenden Wachstums ist, läßt sich auf Grund eigener Versuche nicht entscheiden. Versuche, die Fermentaktivität der GG-Dipeptidase in vitro durch Zugabe von Oestransulfat zu aktivieren, hatten keinen Erfolg. PURR⁶¹ dagegen konnte eine Aktivierung des Kathepsins durch Sexualhormone beobachten.

Während in der ersten Cyclushälfte im Endometrium das Zellwachstum im Vordergrund steht, ist in der zweiten Cyclusphase mehr die Differenzierung der Zelle und die Bildung von Kohlenhydraten vorherrschend. Die Aufnahme der spezifischen Arbeitsfunktion der Schleimhaut in der Sekretionsphase führt zur vermehrten Bildung von Glykogen^{21, 31} und zur Sekretion von Mucin, die basophilen Granula im Zellplasma nehmen schnell an Zahl ab. Das erste morphologische Zeichen der Sekretion stellen die subnucleären Plasmavacuolen dar, die sich histochemisch als Glykogen erweisen.

Bei diesem morphologischen Bild findet sich im Endometrium die höchste Exopeptidaseaktivität. Die Abb. 23 zeigt einen Ausschnitt aus einem Endometrium der beginnenden Sekretionsphase mit sehr hoher Exopeptidaseaktivität. Man sieht auf dieser Abbildung unter den mittelständigen Kernen bei Hamatoxylin-Eosin-Färbung Aufhellungen, die den Plasmavacuolen entsprechen. Formvarianten bei diesem Schleimhautbild wurden von ELSTER u. Mitarb.⁴¹ beschrieben.

Die höchste Exopeptidaseaktivität in der beginnenden Sekretionsphase deutet darauf hin, daß zu dieser Zeit im Endometrium ein Funktionsmaximum besteht. Das dürfte zeitlich etwa mit der Eimplantation^{28, 29} zusammenfallen. Die erhöhte Stoffwechselleistung im Beginn der Sekretionsphase wird durch eine Reihe von chemischen und histochemischen Untersuchungen bestätigt. So fanden HAGERMANN und VILLEE²⁴ zwischen dem 14. und 21. Cyclustag den größten Glykogen-

gehalt, der mit dem Aschegehalt parallel ging, ferner wurde Erhöhung der Glykoproteide gefunden⁵¹. Nach OBER^{55, 56} geht der Glykogenbildung in den Drüsen während des Cyclus als erstes Zeichen einer beginnenden Progesteronwirkung eine maximale Aktivität der histochemisch faßbaren, alkalischen Phosphatase in den Drüsenepithelien voraus. Dem entspricht, daß die chemisch in vitro erfassbare alkalische Glycero-Phosphatase im Endometrium um den 14. 18. Tag ihre größte

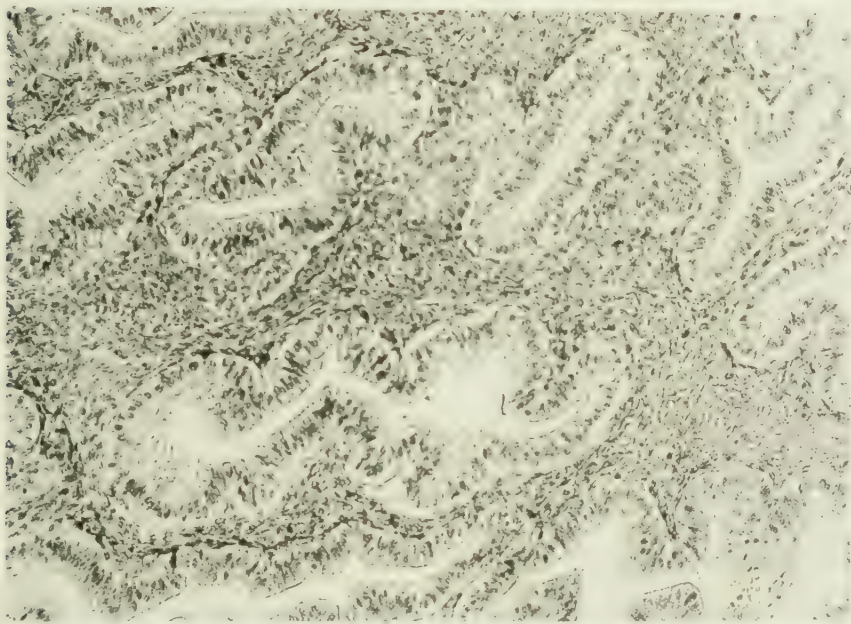


Abb. 23. Endometrium der beginnenden Sekretion mit subnucleären Vacuolenbildungen. Sehr hohe Exopeptidaseaktivität

Aktivität zeigt⁵¹. Im Beginn der Sekretion fanden STÜRMER und STEIN⁸³ die Äpfelsäure-Dehydrogenase, Bernsteinsäure-Dehydrogenase, Cytochromoxydase und Adenosintriphosphatase am aktivsten.

Da diese beschriebenen Veränderungen zeitlich mit der Gelbkörperbildung im Ovar zusammenfallen, liegt es nahe, die Veränderungen im Zellstoffwechsel mit dem Progesteron in Verbindung zu bringen, für dessen Wirkung an den Genitalorganen ein Oestrogeneffekt Voraussetzung ist. Nach dem heutigen Stand der Erkenntnisse (Übersicht bei ZANDER⁹¹) bildet schon der sprungreife Follikel 2 Tage vor der Ovulation größere Mengen Gestagen. Im Corpus luteum wird die größte Gestagenbildung zwischen dem 7. und 8. Tag nach der Ovulation erreicht (s. schematische Abb. 23). Es ist bekannt, daß Progesteron den Gewebsstoffwechsel beeinflussen kann³⁸. Verschiedene Autoren beschrieben einen eiweißanabolen bzw. -katabolen Effekt des Progesterons^{36, 39}.

Von WADE und JONES⁸⁶ wurde die Wirkung von Progesteron auf die ATP und oxydativen Phosphorylierungsvorgänge untersucht. Die vielen Einzelbeobachtungen über die Progesteronwirkung lassen aber bis jetzt noch nicht eine vollständige Reaktionskette innerhalb der Zelle erkennen und auch noch keine Aussage darüber zu, an welchem Punkt und in welcher Weise das Hormon in den Chemismus der Zelle eingreift.

Das auffällige Zusammenfallen der höchsten Peptidaseaktivität im Endometrium mit der Hauptprogesteronwirkung läßt auf Grund obiger Ausführungen an eine Beeinflussung der Aktivität der eiweißspaltenden Fermente durch Progesteron denken. Vorläufig ist diese Annahme aber noch rein hypothetisch, da der direkte Nachweis noch aussteht. In eigenen orientierenden Versuchen konnte in vitro noch keine Beeinflussung der Dipeptidaseaktivität (GG) durch Progesteron gefunden werden.

Der Abfall der Peptidaseaktivität vor der Menstruation ist gut mit dem cyclischen Verhalten der Hormongabe der Ovarien und auch mit dem histologischen Bild in Beziehung zu bringen (s. schematische Abb. 22). Es ist bekannt, daß der Hormonspiegel vor der Menstruation abfällt, und daß eine Rückbildung des Endometriums einsetzt. Das auffälligste Symptom vor der Blutung ist die Schrumpfung der Schleimhaut^{30, 41}. Sie soll, soweit sich Schlüsse aus fortlaufenden Beobachtungen an spontanen und experimentellen Endometriosen ziehen lassen, bis zu 90% der Schleimhautmasse ausmachen. Die Schrumpfung ist Ausdruck des Wasser- und Sekretverlustes; es fallen histologisch regressive Veränderungen an den Drüsenepithelien auf, die Sekretion versiegt, der Golgi-Apparat bildet sich zurück und die Ribonucleinsäuren schwinden. Es ist anzunehmen, daß diese Veränderungen mit einem Abfall der Fermenttätigkeit, insbesondere der Peptidaseaktivität einhergehen.

Auf Grund dieser Ausführungen können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

Die Aktivitätsänderungen der eiweißspaltenden Fermente stehen in enger Beziehung zum histologischen Bild. Die erhobenen Befunde deuten auf eine Beeinflussung der Exopeptidaseaktivität durch Oestrogene und vor allem durch Gestagene hin.

Bei der *glandulär cystischen Hyperplasie*, dem gesteigerten Endometriumwachstum, war die Exopeptidaseaktivität gegenüber dem Endometrium der Proliferation erhöht. Bei 3 von 4 Dipeptidasen ließ sich der Aktivitätsanstieg statistisch sichern. Es besteht heute kein Zweifel, daß die glandulär-cystische Hyperplasie in ihrer ganzen Variationsbreite durch einen verstärkten Oestrogeneffekt^{67, 68} hervorgerufen wird, wobei entscheidend bleibt, daß es nicht zur Ovulation mit Entwicklung eines Corpus luteum kommt. Wir sehen auch hier, daß die Fermentaktivität mit dem durch das Follikelhormon gesteigerten Wachstum des Endo-

metriums parallel geht. Es wird aber anscheinend nicht dieselbe hohe Aktivität erreicht, die sich unter vollem Progesteroneinfluß in der frühen Sekretionsphase ausbildet. Eine geringe Progesteronwirkung ist bei der glandulär-cystischen Hyperplasie nicht ausgeschlossen, wie man aus dem Vorkommen von Glykogen in den Drüsenepithelien annehmen kann (Übersicht s. bei BUSANXY und UNDEUTSCH⁹). Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß Progesteron schon während der Follikelreifung gebildet wird. Die Möglichkeit, daß persistierende Follikel und Follikelcysten zeitweise Progesteron in geringen Konzentrationen zu bilden vermögen, ist deshalb nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen, da diese bis zur vollen Höhe ihrer inkretorischen Aktivität heranreifen.

An der *Decidua* konnten bisher nur wenige Untersuchungen durchgeführt werden, die proteolytische Aktivität in der *Decidua* und die Rolle der *Decidua* als Fermentinhibitor bedarf einer eingehenden Untersuchung.

Die Frage der *Bedeutung der proteolytischen Fermente* und ihrer Rolle bei der Menstruation kann nur kurz gestreift werden. Die alte Vorstellung von HALBAN und FRANKL²⁵, FRANKL und ASCHNER¹⁵ und CAFFIER¹⁰, daß vor der Menstruation von den Uterusdrüsen ein proteolytisches Ferment („Trypsin“) sezerniert wird, damit die Schleimhaut tryptisch abgebaut werden kann (Übersicht s. auch bei BELLER²) bedarf zweifellos einer Revision. Von FRANKL und ASCHNER¹⁵ ist beim Abbau des Seidenpeptons durch Endometrium höchstwahrscheinlich nicht eine Trypsin-, sondern eine Exopeptidase-Aktivität (Di- und Polypeptidasen) untersucht worden. Wenn in dieser Arbeit ein Anstieg der Fermentaktivität vor der Menstruation festgestellt wurde, so ist diese Beobachtung zweifellos richtig, denn es ist auf Grund der eigenen Versuchsergebnisse sicher, daß die Exopeptidaseaktivität in der Sekretionsphase ansteigt.

Die Aktivitätsänderung der Exopeptidasen in Übereinstimmung mit dem histologischen Bild und mit der hormonalen Regulation deutet darauf hin, daß den eiweißspaltenden Fermenten in erster Linie eine Funktion im Eiweißstoffwechsel zukommt, die bei der Vorbereitung der Schleimhaut zur Eiaufnahme am größten ist und bei nicht erfolgter Befruchtung wieder eingeschränkt wird. Es erscheint so gut wie sicher, daß die eiweißspaltenden Fermente auch an der Eiweißsynthese beteiligt sind, wenn auch der Vorgang als solcher bei der vielgestaltigen Struktur der Eiweißstoffe noch nicht endgültig geklärt ist⁹⁰.

Zusammenfassung

In der Arbeit wurden mit neueren analytischen Methoden die Exopeptidasen des Endometriums und anderer Gewebe der weiblichen Genitalorgane untersucht.

1. Durch Spaltungsversuche mit synthetischen Substraten konnte erstmals gezeigt werden, daß das Endometrium Exopeptidasen verschiedenster Spezifität enthält. Im einzelnen konnten folgende spezifische Exopeptidasen nachgewiesen werden: a) *Glycyl-L-leucin-Dipeptidase* (Substrat Glycyl-L-leucin). Die Glycyl-L-leucin-Dipeptidase ist in ungereinigtem Zustand wenig stabil. Das Substrat wird durch Endometriumhomogenat unter den gewählten Versuchsbedingungen optimal zwischen p_H 7.2 und 7.6 gespalten. Die Spaltung verläuft nach der 1. Ordnungsreaktion und proportional der Enzymkonzentration (bis etwa 1% Homogenat). Die Glycyl-L-leucin-Dipeptidase wird unter den gewählten Versuchsbedingungen durch Metallionen mehr oder weniger stark gehemmt. — b) *dl-Alanylglycin-Dipeptidase* (Substrat dl-Alanylglycin). Die Alanylglycin-Dipeptidase wirkt in ungereinigtem Zustand unter den gewählten Versuchsbedingungen optimal zwischen p_H 6.7 und 7.2. Die Spaltung des Substrates dl-Alanylglycin durch Endometriumhomogenat verläuft über einen weiten Bereich nach der 1. Ordnungsreaktion und proportional der Enzymkonzentration (bis zu 0.5% Homogenat). Unter den gewählten Versuchsbedingungen wird die dl-Alanylglycin-Dipeptidase durch Metallionen nicht aktiviert. — c) *Glycylglycin-Dipeptidase* (Substrat Glycylglycin). Die Glycylglycin-Dipeptidase ist in ungereinigtem Zustand ziemlich stabil. Das Substrat Glycylglycin wird durch Endometriumhomogenat unter den gewählten Versuchsbedingungen optimal zwischen p_H 7.2 und 7.8 gespalten. Die Spaltung erfolgt in erster Annäherung einer 1. Ordnungsreaktion. Die Substrathydrolyse ist über einen weiten Bereich annähernd proportional der Enzymkonzentration. Co^{II} und Mn^{II} aktivieren die Glycylglycin-Dipeptidase. — d) *Leucinaminopeptidase* (Substrat L-Leucylglycin). Die Leucinaminopeptidase des Endometriums ist relativ stabil. Das Substrat L-Leucylglycin wird durch Endometriumhomogenat unter den gewählten Versuchsbedingungen in schwach alkalischem Medium bis p_H 8.0 etwa gleichbleibend stark gespalten. Die Spaltung verläuft bis fast zur völligen Aufspaltung nach der 0. Ordnungsreaktion und annähernd proportional der Enzymkonzentration. In Veronalpuffer wird die Leucinaminopeptidase durch Mn^{II} -Ionen aktiviert. — e) *Prolidase* (Substrat Glycyl-L-prolin). Das Substrat Glycyl-L-prolin wird unter den gewählten Versuchsbedingungen durch Endometriumhomogenat hydrolysiert. — f) *Carnosinase* (Substrat β -Alanyl-L-Histidin). Das Endometrium enthält auch eine Carnosinaseaktivität.

2. Es konnte ferner festgestellt werden, daß auch Glycyl-L-Tryptophan durch Endometriumhomogenat hydrolysiert wird.

3. Das Endometrium enthält auch eine Amino-Tripeptidase (Substrat Glycylglycylglycin und L-Leucylglycylglycin). Die Spaltung dieser Substrate verläuft unter den gewählten Versuchsbedingungen in der

Anfangszeit völlig linear. Die Hydrolyse des L-Leucylglycylglycins wird in Veronalpuffer durch Mn^{II} aktiviert.

4. Untersuchungen über die Exopeptidaseaktivität des Endometriums während des mensuellen Cyclus lagen bisher noch nicht vor. Bei 164 Aktivitätsbestimmungen an normalen Endometrien verschiedener Cyclusphasen wurde erstmalig gezeigt, daß die Dipeptidaseaktivität im Endometrium der Sekretionsphase höher ist als im proliferierenden Endometrium. Der Anstieg der Fermentaktivität in der Sekretionsphase konnte bei der Glycylglycin-, der Glycyl-L-leucin-, der dl-Alanylglycin- und der Leucinaminopeptidase statistisch gesichert werden. Auch bei der Glycyl-L-Tryptophan- und der Tripeptid-Hydrolyse war die prozentuale Spaltung in der Sekretionsphase größer.

5. Während des Cyclus steigt die Dipeptidaseaktivität des Endometriums bis zum 15. Tag langsam an. Nach dem Follikelsprung erreicht die Fermentaktivität im Beginn der Sekretionsphase ein Maximum und fällt dann gegen das Cyclusende zu wieder ab. Vor der Menstruation ist die Fermentaktivität trotzdem immer noch höher als in der Proliferationsphase. Der Anstieg der Aktivität in der Proliferationsphase und der Abfall in der Sekretionsphase mit Gipfelbildung im Beginn der Sekretion konnte bei der Glycyl-L-leucin-Dipeptidase statistisch gesichert werden; bei der dl-Alanylglycin- und der Leucinaminopeptidase ist der Anstieg und der Abfall der Fermentaktivität sehr wahrscheinlich.

6. Das Verhalten der Exopeptidaseaktivität des Endometriums während des Cyclus stimmt gut mit dem histologischen Bild des Endometriums überein. Das Maximum der Dipeptidaseaktivität findet sich in Schleimhäuten, bei denen histologisch als erstes Zeichen der Transformation Glykogen subnucleär im Drüsenepithel nachweisbar ist.

7. Das Verhalten der Fermentaktivität während des Cyclus mit einem Anstieg in der Proliferationsphase unter Oestrogeneinfluß und einer Gipfelbildung im Beginn der Sekretionsphase zur Zeit der Hauptprogesteronwirkung deutet auf eine Beeinflussung der Fermentaktivität durch Oestrogene, vor allem aber durch Gestagene hin.

8. Beim übersteigerten Wachstum der Schleimhaut, histologisch als glandulär-cystische Hyperplasie erkennbar, ist die Exopeptidaseaktivität (3 von 4 Dipeptidasen) signifikant höher als im proliferierenden Endometrium.

9. Die Ergebnisse sprechen im Gegensatz zu der Annahme früherer Untersucher nicht dafür, daß vor der Menstruation ein besonderes eiweißspaltendes Ferment produziert bzw. im Endometrium bereitgestellt wird, um die Schleimhaut schnell abzubauen. Die hohe Aktivität im Funktionsmaximum der Schleimhaut, das zeitlich mit der Eiimplantation zusammenfällt, deutet darauf hin, daß den eiweißspaltenden Fermenten hauptsächlich eine Aufgabe im Eiweißstoffwechsel zukommt.

Literatur

- ¹ ABDERHALDEN, E.: Notiz zum Nachweis proteolytischer Fermente in Tier- und Pflanzengewebe. *Z. phys. Chem.* **66**, 137 (1910). — ² BELLER, F. K., u. H. GRAF: *Arch. Gynäk.* **188**, 411 (1956). — ³ BERGMANN, M., L. ZERVAS u. H. SCHLEICH: Über proteolytische Enzyme. II. Mitt. Bindungsart des Prolins in der Gelatine. *Ber. dtsch. chem. Ges.* **65**, 1747 (1932). — ⁴ BERGMANN, M., L. ZERVAS, H. SCHLEICH u. F. LEINERT: Über proteolytische Fermente. Verhalten von Prolinpeptiden. *Z. physiol. Chem.* **212**, 72 (1932). — ⁵ BERGMANN, M., u. J. S. FRUTON: Ein neuer Enzymtyp im Verdauungstrakt. *Science* **83**, 306 (1936). — ⁶ BERGMANN, M., and J. S. FRUTON: On proteolytic enzymes. XII. Regarding the specificity of aminopeptidase and carboxypeptidase. A new type of enzyme in intestinal tract. *J. biol. Chem.* **117**, 189 (1937). — ⁷ BERGMANN, M.: Classification of proteolytic enzymes. *Advanc. Enzymol.* **2**, 49 (1942). — ⁸ BROOMLEY, N. W., u. W. N. ORCHOWITZ: Über Proteolyse in regenerierenden Geweben. *Biol. generalis (Wien)* **11** (II), 317 (1935). — ⁹ BUSANNY-CASPARI, W., u. D. UNDEUTSCH: Zum Vorkommen von Glykogen bei der glandulär-cystischen Hyperplasie. *Arch. Gynäk.* **188**, 1 (1956). — ¹⁰ CAFFIER, P.: Die Rolle des menschlichen Uterus als mesodermales Verdauungsorgan. *Munch. med. Wschr.* **77**, 389 (1930). — ¹¹ ELSTER, K., G. HEILMANN u. H. OTTO: Eine histomorphologische Formvariante der Uterusschleimhaut bei ovarieller Dysfunktion. *Arch. Gynäk.* **190**, 31 (1957). — ¹² ENGEL, F. L., and TH. B. SCHWARTZ: Adrenal cortex and peptidase activity of rat tissue. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **77**, 615 (1951). — ¹³ ERPF-LEFKOVICS, TH. A., u. J. ROSENBLUM: Die Biochemie des weiblichen Genitales. *Biochem. Bull.* **2**, 233 (1913). — ¹⁴ ESCHBACH, W., u. E. NEGELEIN: Die Wirkung von Oestradiol und Progesteron auf den Stoffwechsel des Uterus infantiler Mäuse usw. *Arch. Gynäk.* **188**, 84 (1956). — ¹⁵ FRANKL, O., u. B. ASCHNER: Zur quantitativen Bestimmung des tryptischen Ferments in der Uterusmucosa. *Gynäk. Rdsch.* **5**, 647 (1911). — ¹⁶ FRUTON, J. S., V. A. SMITH and P. E. PRISCOLL: On the proteolytic enzymes of animal tissues. VIIa. Peptidase of calf thymus. *J. biol. Chem.* **173**, 457 (1948). — ¹⁷ FUHRMANN, K.: Über die eiweißspaltenden Fermente der weiblichen Genitalorgane unter besonderer Berücksichtigung des Endometriums. *Habil.-Schr. Erlangen* 1958. — ¹⁸ GARKOVI, P. G.: *Bull. Biol. med. exp. URSS.* **4**, 57 (1937). *Zit. in Chem. Abstr.* **32**, 8514 (1938) u. *HOFFMANN-OSTENHOF*, *Enzymologie*, S. 305. *Wien: Springer* 1954. — ¹⁹ GRAEFENBERG, E.: Beiträge zur Physiologie der Eieinbettung. *Z. Geburtsh.* **65**, 1 (1910). — ²⁰ GRASSMANN, W., u. H. DYCKERHOFF: Über die Proteinase und Polypeptidase der Hefe. *Z. physiol. Chem.* **179**, 41 (1928). — ²¹ GRASSMANN, W., u. W. HEYDE: Alkalimetrische Mikrobestimmung der Aminosäuren und Peptide. *Z. physiol. Chem.* **183**, 32 (1929). — ²² GRASSMANN, W., u. L. KLENK: Zur Frage der Einheitlichkeit tierischer und pflanzlicher Dipeptidase. *Z. physiol. Chem.* **186**, 26 (1930). — ²³ GRASSMANN, W., u. W. HEYDE: Über Peptidasen im Serum. *Z. physiol. Chem.* **188**, 69 (1930). — ²⁴ HAGERMANN, D. D., and C. A. VILLEE: Effects on the menstrual cycle on the metabolism of human endometrium. *Endocrinology* **53**, 667 (1953). — ²⁵ HALBAN, J., u. O. FRANKL: Zur Biochemie der Uterusmucosa. *Gynäk. Rdsch.* **5**, 13, 38 (1910). — ²⁶ HANSON, H. T., and E. L. SMITH: The application of peptides containing β -alanin to the study of the specificity of various peptidases. *J. biol. Chem.* **175**, 833 (1948). — ²⁷ HANSON, H. T., and E. L. SMITH: Carnosinase: an enzyme of swine kidney. *J. biol. Chem.* **179**, 789 (1949). — ²⁸ HERTIG, A. T., and J. ROCK: On development of early human ovum etc. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **47**, 149 (1944). — ²⁹ HERTIG, A. T., and J. ROCK: Two human ova of previllous stage, having development age of about seven and nine days resp. *Contrib. Embryol.* **31**, 65 (1945). — ^{29a} *HOFFMANN-OSTENHOF*, O.: *Enzymologie*. *Berlin: Springer* 1954. — ³⁰ *HOFFMANN*, L., K. G. OBER u. A. SCHMITT: Beobachtungen an einer Scheidenendometriose. *Geburtsh. u. Frauenheilk.* **13**, 881 (1953). — ³¹ HUGHES, E. C.: The intrinsic metabolism of the endometrium of

the uterus. Proc. in Gynecology, vol. II, p. 87. New York: Grune & Stratton 1950. — ³² HUNTER, A., and C. E. DOWNS: The measurement of arginase activity. J. biol. Chem. **155**, 173 (1944). — ³³ IRVING jr., G. W., J. S. FRUTON and M. BERGMANN: Kinetics of proteinase action. Application to specificity problems. J. biol. Chem. **138**, 231 (1941). — ³⁴ JOHNSON, M. J., G. H. JOHNSON and W. H. PETERSON: The magnesium-activated leucyl-peptidase of animal crepsin. J. biol. Chem. **116**, 515 (1936). — ³⁵ JUNG, W.: 32. Tagg Dtsch. Ges. für Gynäkologie (im Druck). — ³⁶ KAYLE, L. H., u. W. C. HESS: Effect of progesterone and anhydro-hydroxyprogesterone on nitrogen-balance. J. Lab. clin. Med. **47**, 278 (1956). — ³⁷ KOLLER, S.: Statistische Auswertungsmethoden. Biochemisches Taschenbuch, S. 1184. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956. — ³⁸ KUNZ, W., u. H. BURGER: Über die Beeinflussung des Gewebestoffwechsels durch Progesteron. Z. ges. exp. Med. **123**, 225 (1954). — ³⁹ LANDAU, H. L.: The metabolic effects of progesteron in man. J. clin. Endocr. **15**, 1194 (1955). — ⁴⁰ LANG, K.: Die Biologie der Enzyme. 4. Colloquium der Ges. für physiol. Chemie 17. 18. April 1953 in Mosbach (Baden). Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953. — ⁴¹ LINDERSTRØM-LANG, K.: Über Darmerepsin. Z. physiol. Chem. **182**, 151 (1929). — ⁴² LINDERSTRØM-LANG, K.: Über die Einheitlichkeit der Darmdipeptidase. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **188**, 48 (1930). — ⁴³ LOEB, W.: Milz und Ovarialenzyme. Physiol. Ges. zu Berlin. Sitzgg vom 1. u. 15. Dez. 1911. Ref. Jber. Gynäk. **26**, 296 (1912). — ⁴⁴ MARKEE, J. E.: The morphological and endocrine basis for menstrual bleeding. In: Progress in Gynecology II, p. 63. Meigs and Sturgis edit. New York: Grune & Stratton 1950. — ⁴⁵ MASCHMANN, E.: Zur Kenntnis der Peptidasen. XII. Mitt. Biochem. Z. **311**, 374 (1942). — ⁴⁶ MASCHMANN, E.: Zur Kenntnis der Peptidasen des Blutserums. Biochem. Z. **308**, 359 (1941). — ⁴⁷ MASCHMANN, E.: Zur Kenntnis der Peptidasen. XIII., XIV. u. XV. Mitt. Biochem. Z. **313**, 129, 151, 156 (1942). — ⁴⁸ MASCHMANN, E.: Zur Kenntnis der Peptidasen. XVII. Mitt. Biochem. Z. **315**, 1 (1943). — ⁴⁹ MASCHMANN, E.: Zur Kenntnis der Peptidasen. V. Mitt. Biochem. Z. **310**, 28 (1941). — ⁵⁰ MATHIES, J. C., L. PALM and O. H. GAEBLER: Effects of hypophysectomy, growth hormone, thyroxin and food intake on cathepsin activity of rat tissue. Endocrinology **49**, 571 (1951). — ⁵¹ MCKAY, D. G., A. G. HERTIG, W. A. BARDAWIL and J. T. VELARDO: Histochemical observations on the endometrium. I. Normal endometrium. J. Obstet. Gynaec. **8**, 22 (1956). — ⁵² NAKAHORI, K.: Investigation of the ferments in the uterine cancer. Part VI. Ereptase in the uterine cancer. Jap. J. Obstet. Gynec. **18**, 120 (1935). — ⁵³ NEUBAUER, O., u. H. FISCHER: Über das Vorkommen eines peptidspaltenden Fermentes im carcinomatösen Mageninhalt und seine diagnostische Bedeutung. Dtsch. Arch. klin. Med. **97**, 499 (1909). — ⁵⁴ NORBERG, B.: On proteins in regenerating rat liver. II. Proteolytic enzymes. Acta physiol. scand. **20**, 180 (1950). — ⁵⁵ OBER, K. G.: Die Behandlung der unzulänglichen Keimdrüsenfunktion. In L. SEITZ u. A. AMREICH, Biologie und Pathologie des Weibes, Bd. II/II, S. 725. Berlin-München: Urban & Schwarzenberg 1952. — ⁵⁶ OBER, K. G.: In A. LABHARDT, Klinik der inneren Sekretion. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957. — ⁵⁷ ORCHOWITSCH, W. N.: Die Veränderung der Aktivität der Dipeptidasen in den regenerierenden Geweben der Amphibien. Biochem. Z. **286**, 91 (1936). — ⁵⁸ PETRY, G.: Die Proteinasen im Liquor folliculi und ihre Bedeutung für den Follikelsprung. Fermentforsch. **17**, 185 (1945). — ⁵⁹ PETRY, G.: Die Ursachen der Ovulation. Z. Geburtsh. Gynäk. **130**, 236 (1949). — ^{59a} POLANO, O.: Über Verschwinden einer Schwangerschaft. Z. Geburtsh. Gynäk. **59**, 453 (1907). — ⁶⁰ POTTER, V. R., u. C. A. ELVEHJEM: A modified method for the study of tissue oxidations. J. biol. Chem. **114**, 495 (1936). — ⁶¹ PURR, A.: Über die Aktivierung des Kathepsins und Papains durch Follikelhormon. Biochem. Z. **320**, 74 (1949). — ⁶² ROCHE, J., N. V. THOAI u. M. ROGER: Arch. internat. Physiol. **54**, 209 (1946). Zit. n. SMITH, E. L., The peptidasen of sceletal, heart and uterine muscle. J. biol. Chem. **173**, 553 (1948). — ⁶³ ROCHE, J., u. B. NATAF: Action d'hormones sexuelles

et de la gestation sur diverses activités enzymatiques de l'utérus (arginase, peptidase, phosphatase alcaline). *Bull. Soc. chim. Biologique* 6—7, 36, S. 799 (1954). — ⁶⁴ ROEMER, H.: *Arch. Gynäk.* **186**, 259 (1955). — ⁶⁵ ROSSI, R.: The cytochromoxydase activity in the uterus of experimental animals. *Experientia* **8**, 386 (1952). — ⁶⁶ RUNGE, H., u. H. EBNER: Die Bedeutung der Histochemie für die Gynäkologie. In T. ANTOINE, *Klinische Fortschritte in der Gynäkologie*, S. 141. Berlin-München: Urban & Schwarzenberg 1954. — ^{66a} SCHELLING, H. V.: *Zit. in E. WEBER, Grundriß der biologischen Statistik*, S. 157. Jena 1948. — ⁶⁷ SCHROEDER, R.: Anatomische Studie zur normalen und pathologischen Physiologie des Menstrualzyklus. *Arch. Gynäk.* **104**, 27 (1915). — ⁶⁸ SCHROEDER, R.: Die Klinik des normalen und gestorten menstruellen Zyklus. *Arch. Gynäk.* **183**, 204 (1953). — ⁶⁹ SCHWARTZ, T. B., F. L. ENGEL and C. C. TOWBIN: Peptidase-activity of surviving rat diaphragm. *J. biol. Chem.* **197**, 1 (1952). — ⁷⁰ SMITH, E. L., and M. BERGMANN: The activation of intestinal peptidases by manganese. *J. biol. Chem.* **138**, 789 (1941). — ⁷¹ SMITH, E. L., and M. BERGMANN: The peptidases of intestinal mucosa. *J. biol. Chem.* **153**, 627 (1944). ⁷² SMITH, E. L.: Manganese and L-leucine-aminoexopeptidase. *J. biol. Chem.* **163**, 15 (1946). — ⁷³ SMITH, E. L.: The peptidases of skeletal, heart and uterine muscle. *J. biol. Chem.* **173**, 553 (1948). — ⁷⁴ SMITH, E. L.: The glycylglycine dipeptidases of skeletal muscle and human uterus. *J. biol. Chem.* **173**, 571 (1948). — ⁷⁵ SMITH, E. L.: Studies on dipeptidases. II. Some properties of the glycyl-L-leucine dipeptidase of animal tissue. *J. biol. Chem.* **176**, 9 (1948). — ⁷⁶ SMITH, E. L.: Studies on dipeptidases. III. Hydrolysis of methylated peptides, the role of cobalt in the action of glycylglycine-dipeptidases. *J. biol. Chem.* **176**, 21 (1948). — ⁷⁷ SMITH, E. L.: The mode of action of the metal peptidases. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **35**, 80 (1949). — ⁷⁸ SMITH, E. L., and R. LUMRY: Some consideration of the interaction of the metal peptidase with their substrates. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **14**, 168 (1950). — ⁷⁹ SMITH, E. L.: In J. B. SUMNER and K. MYRBACK, *The Enzymes*, p. 792. New York: Academic Press 1951. — ⁸⁰ SMITH, E. L., and D. H. SPACKMAN: Leucinaminopeptidase. V. Activation, specificity and mechanism of action. *J. biol. Chem.* **212**, 271 (1955). — ⁸¹ SPACKMAN, D. H., E. L. SMITH and D. M. BROWN: Leucine aminopeptidase. IV. Isolation and properties of the enzyme from swine kidney. *J. biol. Chem.* **212**, 255 (1955). — ⁸² STARK, G., u. G. SIEBRET: Kathepsinaktivität in Placenten verschiedener Altersstufen. *Arch. Gynäk.* **185**, 50 (1954). — ⁸³ STURMER, V. N., and R. J. STEIN: Cytodynamic properties of human endometrium. Metabolism and enzymatic activity of human endometrium during menstrual cycle. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **63**, 359 (1952). — ⁸⁴ TACHIBANA, T.: Investigation of ferments in the secretion of ovarian cysts. IV. Trypsin. VI. Pepsin. *Jap. J. Obstet. Gynec.* **12**, 182, 200 (1929). *Ref. Ber. ges. Gynäk. Geburtsh.* **17**, 358 (1930). — ⁸⁵ VORHERR, H.: Kathepsinaktivität im menschlichen Endometrium. *Inaug.-Diss. Johann-Gutenberg-Universität Mainz 1955*. — ⁸⁶ WADE, R., and H. W. JONES jr.: Inhibition of human endometrial adenosin phosphatase by progesterone. *Obstet. and Gynec.* **3**, 608 (1954). — ⁸⁷ WALDSCHMIDT-LEITZ, E., u. A. SCHAFFNER: Zur Kenntnis des Darmerepsins. *Hoppe Seylers Z. physiol. Chem.* **151**, 31 (1926). — ⁸⁸ WALDSCHMIDT-LEITZ, E., A. K. BALLS u. J. WALDSCHMIDT-GRASER: Über Dipeptidase und Polypeptidase aus Darmschleimhaut. XVI. Mitt. Zur Spezifität tierischer Proteasen. *Ber. dtsh. chem. Ges.* **62**, 956 (1929). — ⁸⁹ WEISS, B.: Peptidase and proteinase activity of beef thyroid tissue. *J. biol. Chem.* **205**, 193 (1953). — ⁹⁰ WISS, O.: Stoffwechsel der Eiweißstoffe und Aminosäuren. In B. FLASCHENTRÄGER u. E. LEHNARTZ, *Physiologische Chemie*, Bd. II, 1b, S. 909. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954. — ⁹¹ ZANDER, J.: Die gestagen wirksamen Hormone im Organismus. *Geburtsh. u. Frauenheilk.* **17**, 876 (1957).

Privatdozent Dr. KARL FUHRMANN, Erlangen,
Universitäts-Frauenklinik

Nicht einzeln im Buchhandel käuflich

Sonderdruck aus „Zeitschrift für Geburtshilfe und Gynäkologie“

154. Band, 2. Heft, Seite 168—194. 1960

Herausgegeben von Geh. Med.-Rat Prof. Dr. W. Stoeckel in Berlin

Ferdinand Enke / Verlag / Stuttgart

Aus der Univ.-Frauenklinik Erlangen (Direktor: Prof. Dr. R. Dyroff)

Über die Endopeptidaseaktivität (Kathepsinkomplex) des Endometriums und anderer Gewebe weiblicher Genitalorgane

Von **Karl Fuhrmann**

Mit 3 Abbildungen und 9 Tabellen

1. Einleitung

Über die proteolytischen Fermente der Genitalorgane wissen wir insgesamt nur sehr wenig. Wohl liegen eine Reihe von Arbeiten vor, diese sind aber vorwiegend älteren Datums und dem damaligen Wissensstand entsprechend mit Methoden durchgeführt worden, die einer exakten Beurteilung der Ergebnisse auf Grund neuerer Erkenntnisse nicht mehr ohne weiteres standhalten.

So beruhen unsere heutigen Vorstellungen über die proteolytische Fermenttätigkeit des Endometriums im wesentlichen noch auf den Arbeiten von Graefenberg 1910 (26), Halban u. Frankl 1910 (28), Frankl u. Aschner 1911 (17) und Caffier 1930 (11). Hierbei wurde die Fermentaktivität des Endometriums mit groben Schätzungsmethoden entweder nach der Menge der aus einer Seidenpeptonlösung enzymatisch abgespaltenen Tyrosinkristalle (17) oder nach der Tiefe der auf einer Serumplatte gebildeten Delle (11, 26, 28) beurteilt. Nach diesen Untersuchungen soll in der prämenstruellen Gebärmutter Schleimhaut ein trypsinähnliches Ferment vorkommen, das für den „tryptischen“ Abbau des Endometriums verantwortlich gemacht wird, wobei auch noch der Gehalt des Endometriums an „Antitrypsin“ eine Rolle spielen soll. Nach Ansicht der Untersucher wird das proteolytische Enzym von den Schleimhautdrüsen vor der Menstruation sezerniert. Es ist erstaunlich, daß diese Beobachtungen mit ihren weitgehenden und in fast alle Lehrbücher eingegangenen Schlußfolgerungen vor der Klassifizierung der eiweißspaltenden Fermente kaum nachgeprüft wurden. Über die Exopeptidasen des Endometriums ist außer der Feststellung von Nakahori (44), daß im Endometrium eine „Ereptase“ vorkommt, nichts bekannt. Vergleichende Untersuchungen über die Exopeptidaseaktivität des Endometriums während der verschiedenen Zyklusphasen fehlen ganz. In neuerer Zeit wurde die Endopeptidaseaktivität (Kathepsinkomplex) während des Zyklus von Stark u. Vorherr (68) untersucht.

Ebenso gering sind unsere Kenntnisse über die eiweißspaltenden Fermente der Uterusmuskulatur, an deren Vorkommen von Caffier (11) gezweifelt wurde. Nur Exopeptidasen wurden bisher von Smith (59, 60) und von Roche und Nataf (53) mit Sicherheit nachgewiesen. Ein Vergleich der Fermentaktivität des Endometriums mit der des Myometriums liegt noch nicht vor.

Über das Vorkommen von proteolytischen Fermenten im Eierstock sind die Angaben sehr verschieden. Während Graefenberg (26), Caffier (11) kein „Trypsin“ und Loeb (37) kein „Erepsin“ fanden, soll nach Erpf-Lefkovic u. Rosenbloom (14) in der Schwangerschaft eine alkalische Protease von stärkerer Aktivität auftreten. Nach Tachibana (64) kommen in Eierstockzysten proteolytische Fermente vom Typ des Trypsins und Pepsins vor, auch Petry (49, 50) konnte in der Follikelflüssigkeit Proteasen nachweisen. Jung (34) stellte im Follikelinhalt Kathepsin fest. Roemer (54) wies eine Ovoprotease nach. Untersuchungen über die eiweißspaltenden Fermente im Corpus luteum sind uns nicht bekannt.

Von allen weiblichen Genitalorganen ist wohl die Plazenta am meisten in bezug auf eiweißspaltende Fermente untersucht worden. Das ist bei der großen Bedeutung der Plazenta für den Stoffaustausch zwischen Mutter

und Kind verständlich. Es geht aus den älteren Arbeiten hervor, daß in der Plazenta sowohl Exopeptidasen (1, 4, 15, 16, 38, 67 u. a.) als auch Endopeptidasen vorkommen (1, 4, 5, 11, 16, 26, 51 u. a.), die sowohl im sauren, als auch im alkalischen Milieu wirksam sind. Vergleichende Untersuchungen über Fermentaktivität in den verschiedenen Schwangerschaftsmonaten hatten sehr verschiedene Ergebnisse, die wohl in erster Linie der Methodik zuzuschreiben sind (26, 11, 51, 63).

Die Übersicht über die eiweißspaltenden Fermente zeigt, wieviel Fragen noch ungeklärt sind.

In der vorliegenden Arbeit werden die proteolytischen Fermente des Endometriums und einiger anderer Gewebe der Genitalorgane untersucht. Bekanntlich wurden früher die eiweißspaltenden Enzyme in Proteinasen und in Peptidasen unterteilt. Da sich in den letzten Jahren gezeigt hat, daß alle gut charakterisierten Proteinase (z. B. Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin) auch synthetische Peptide und ihre Derivate spalten können, unterscheidet man heute nach Bergmann (6) zwischen Endopeptidasen und Exopeptidasen. Die Exopeptidasen wirken auf einfache Verbindungen, die eine oder mehrere freie terminale polare Gruppen besitzen, wie eine α -Amino- oder α -Carboxylgruppe oder beide. Im Gegensatz dazu können Endopeptidasen Verbindungen hydrolysieren, welche keine freien terminalen Amino- oder Carboxylgruppen besitzen, oder die polaren Gruppen an anderer Stelle als in α -Stellung zur Peptidbindung enthalten. Die Endopeptidasen sind fähig, auf die zentrale Peptidbindung von Eiweißen oder auf substituierte Peptide der entsprechenden Konfiguration einzuwirken.

Beim Kathepsin, das von Willstätter u. Bamann 1928 (71) erstmalig beschrieben wurde, erhoben sich bald Zweifel an der Einheitlichkeit des Enzyms. Die neueren Untersuchungen (6, 18, 19, 20, 21, 27) haben eindeutig gezeigt, daß das Kathepsin kein einheitliches Ferment ist, sondern daß es ein Enzymkomplex ist, in dem Endopeptidasen, die mit Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin homospezifisch sind und Exopeptidasen vom Typ der Leucinaminopeptidase und Carboxypeptidase enthalten sind. Eine Übersicht über die gegenwärtige Klassifikation des Kathepsins wird von Smith in Sumner-Myrbäck 1951 (61) und von Tallantire u. Jones, Fruton 1952 (65) gegeben. Krystallines Chymotrypsin besitzt eine zweifache Spezifität, in dem es sowohl wie eine Endo- als auch wie eine Aminopeptidase wirkt. In ungereinigten Enzymlösungen sind sicher noch andere katheptische Enzyme wirksam, die allerdings noch zu wenig untersucht sind, um klassifiziert zu werden. So enthalten rohe Kathepsinpräparationen Endopeptidasen, die Verbindungen wie Benzoylglyzinamid, Carbobenzoxy-L-isoglutamin (18) und Carbobenzoxy-L-serinamid hydrolysieren (22).

Da uns synthetische Substrate nur in geringer Menge zur Verfügung standen, führten wir unsere Untersuchungen mit der auch heute noch häufig angewandten Methode zur Kathepsinbestimmung mit Hämoglobin (Hb) (46) als Substrat bei pH 3,5 durch. Bei dieser Methode wird die Wirkung der ganzen Fermentgruppe erfaßt, wobei allerdings nicht zu entscheiden ist, welche der Endo- und Exopeptidasen die Hauptwirkung ausübt.

2. Arbeitsmethodik

Durchführung der Versuche.

Methodisches zur Auswertung und Darstellung der Versuchsergebnisse

a) Gewebezubereitung

Zu den Fermentaktivitätsbestimmungen am Endometrium stand uns jeweils nur eine geringe Menge Frischgewebe zur Verfügung, so daß sich eine teilweise Reinigung der Fermente, insbesondere die Herstellung von Azetontrockenpulver, nicht durchführen ließ. Da außerdem hierbei unkontrollierbare Verluste der Exopeptidaseaktivität auftreten (59), mußten wir uns für unsere Vergleichsuntersuchungen am Endometrium auf Arbeiten mit ungereinigten Enzymlösungen beschränken. Das Gewebe wurde unmittelbar nach der Operation entnommen. Ein Teil des Gewebes diente zur histologischen Untersuchung. Ein anderer Teil des Gewebes wurde gewogen und anschließend unter Zugabe einer bestimmten Menge H_2O (1 Gewebeteil + 9 Teile H_2O) unter Kühlung in einem Glashomogenisator nach Potter u. Elvehjem (52) zerkleinert. Nach 3 Minuten Homogenisierung (1200 U/min.) ergab die mikroskopische Untersuchung nur noch Zelltrümmer. Das 10proz. Homogenat wurde bei 5 ° im Eisschrank bis zur Untersuchung aufbewahrt. Die Untersuchungen wurden in der Regel 6 bis 8 Stunden nach der Materialgewinnung durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt hat, wie Enzymstabilitätsuntersuchungen an verschiedenen Substraten ergaben, noch keine nennenswerte Fermentinaktivierung eingesetzt. Zu den Untersuchungen wurden nur Endometrien verwandt, die makro- und mikroskopisch keine krankhaften Veränderungen aufwiesen. Die Festlegung des Zyklustages erfolgte auf Grund klinischer Beobachtung oder nach den anamnestischen Angaben der Patientin (Regelkalender).

b) Stickstoffbestimmung

Um eine Bezugsbasis für vergleichende Untersuchungen zu haben, wurde von jedem Homogenat der Gesamtstickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt. Die ermittelten Stickstoffwerte wurden berechnet in mg Gesamtstickstoff pro ml Enzymlösung.

c) Spektrophotometrische Bestimmung der Endopeptidaseaktivität (Kathepsinkomplex) mit Hämoglobin als Substrat

Die Kathepsinaktivität wurde spektrophotometrisch mit dem Beckman-Quarz-Spektrophotometer DU nach der von Northrop (46) angegebenen Modifikation der Originalmethode von Anson (2, 3) mit Hämoglobin als Substrat bestimmt. Bei dieser Methode wird nach der enzymatischen Aufspaltung des Substrates die Extinktion des Trichloressigsäurefiltrates bei einer Wellenlänge von 280 m μ gemessen. Diese entspricht unter den gewählten Versuchsbedingungen der maximalen Ultraviolettabsorption der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan (32). Nach Panlitschko (48) ist diese Methode etwa 10mal empfindlicher als die häufig angewandte kolorimetrische Bestimmungsmethode nach Anson (3). Die Inkubationszeiten können bei Anwendung dieser Methode sehr kurz gewählt werden (10 Min.). Das hat den Vorteil, daß man einmal nur die ersten Stadien der Proteolyse erfaßt und zum anderen, daß man unter Bedingungen messen kann, bei denen die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymkonzentration proportional verläuft.

Herstellung der Substratlösungen

Als Substrat wurde Trockenhämoglobin (Behringwerke) verwandt, das nach Merten (41), Orringer u. Mitarb. (47) durch Kathepsin im gleichen Maße wie Naßhämoglobin abgebaut wird. Zu 4 ml einer 2,5 % wäßrigen, zentrifugierten und filtrierten Hämoglobinlösung wurden 1 ml Azetatpuffer (1,35 M Essigsäure, 0,02 M Ammoniumsulfat, pH 3,5) zugegeben. Die Substratlösung wurde bei 5 °C aufbewahrt und mußte täglich erneuert werden, da sonst der Leerwert anstieg.

Standardansatz

Zur Aktivitätsbestimmung wurden in der Regel 10 % wäßrige Gewebehomogenate (Herstellung s. S. 171) verwandt. Der Standardansatz bestand aus:

1 ml Gewebehomogenat

5 ml Substratlösung (2,5 % Hämoglobin in Azetat-Ammoniumsulfatpuffer pH 3,5)

1 ml Aqua dest.

Aktivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Kathepsinaktivität wurde zu 5 ml Substratlösung von 37 °C 1 ml H₂O und 1 ml Gewebehomogenat gegeben und die Fermenteinwirkung genau nach 10 Min. und 20 Min. durch Zugabe von 9 ml 0,3 M Trichloressigsäure unterbrochen. Dann wurden die Reaktionsgefäße geschüttelt und wieder für 10 Min. ins Wasserbad gestellt. Nach erneuter Durchmischung wurde die Suspension durch Filter 598 (Fa. Schleicher &

Schüll) filtriert. Im klaren Filtrat wurde die Absorption bei 280 m μ und 10 mm Schichtdecke mit einem Beckman-Quarzspektrophotometer DU bestimmt.

Substrat-Wasser Leerversuch

Bei Inkubation von 5 ml gepufferter Hämoglobinlösung (pH 3,5) über einen längeren Zeitraum kommt es erst nach mehreren Stunden zu einer Zunahme der Extinktion. In der für die Fermentversuche gewählten kurzen Inkubationszeit (10 Min.) war eine Aufspaltung des Substrates nicht erkennbar.

Enzym-Wasser Leerversuch

Bei Inkubation der Enzymlösung (10⁻⁶ Homogenat) in Azetatpuffer pH 3,5 zeigte sich erst nach 6 Std. ein geringerer Extinktionsanstieg von $E = 0,07$. In der für die Aktivitätsbestimmung üblichen Zeit von 10 Min. machte sich keine Autolyse bemerkbar.

Enzym-Substrat Leerversuch

Dieser Wert wurde bei jeder Aktivitätsbestimmung ermittelt. Hierzu wurden bei jedem Fermentversuch 5 ml Substratlösung + 1 ml H₂O und Enzymlösung getrennt unter den gleichen Versuchsbedingungen (37 °C) inkubiert. Nach Beendigung des Fermentversuches wurden Enzym- und Substratlösung zusammengegeben und sofort mit 9,0 ml 0,3 M Trichlor-essigsäure gefällt. Zur Ermittlung des Proteolysegrades wurde dieser Wert von den bei den Fermentversuchen erhaltenen Werten abgezogen.

d) Fehlerberechnung

Die Streubreite der Einzelbestimmung S betrug nach der Formel $S^2 = \frac{\sum (\bar{x}^i - \bar{x})^2}{n-1}$ bei 5 verschiedenen Aktivitätsbestimmungen aus dem gleichen Ausgangsmaterial $E = 0,046 \pm 0,003 = 0,046 \pm 7,1 \%$.

e) Zur Darstellung der Versuchsergebnisse

Die Endopeptidaseaktivität gegenüber Hämoglobin bei pH 3,5 wird in Kathepsineinheiten ausgedrückt. Eine Kathepsineinheit Hämoglobin = (K.E.)^{Hb} wird definiert als die Menge von Enzym, die unter den gewählten Versuchsbedingungen in 7 ml Standardansatz bei einer Inkubationszeit von 10 Min. bei 37 °C nach Abzug des Enzym-Substrat Leerwertes eine Extinktion von 1,0 ergibt (280 m μ , 10 mm Schichtdecke). Zu vergleichenden Untersuchungen wurde die spezifische Aktivität = (K.E.) $\frac{Hb}{Ges. N}$ errechnet. Diese wird definiert als Kathepsineinheit pro mg Ges N/ml Enzymlösung.

f) Statistisches Verfahren zur Sicherung der Versuchsergebnisse

Die Standardabweichung s wurde nach folgender Formel errechnet:

$$s^2 = \frac{1}{n-1} : \left\{ \sum (x_i - \bar{x})^2 - \left[\frac{\sum (x_i \cdot \bar{x})}{n} \right] \right\}$$

die mittlere Abweichung der wahren Mittelwerte beim Stichprobenumfang n nach

$$\frac{s}{\sqrt{n}}$$

Zur Prüfung, ob die Mittelwerte der Gruppen statistisch gesichert voneinander abweichen, wurde das t -Verfahren (55) benutzt. Dabei wurde aus der quadratischen Abweichung der Differenz

$$\frac{s_d^2}{d} = \frac{s_1^2 (N_1 - 1) + s_2^2 (N_2 - 1)}{N_1 + N_2 - 2}$$

$$\text{die Prüfgröße } t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s_d} \cdot \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}}$$

gebildet und an Hand einer Tabelle nach der Zahl der Freiheitsgrade ($N_1 + N_2 - 2$) die statistische Sicherung (nicht gesichert, wahrscheinlich, gesichert) abgelesen.

3. Untersuchungsergebnisse

a) Endometrium

Reaktionskinetische Untersuchungen. Stabilität

Um die Beständigkeit des Endometriumkathepsin zu prüfen, wurde in mehreren Versuchen die Enzymaktivität sowohl unmittelbar nach der Gewebentnahme als auch nach verschieden langer Aufbewahrung bei 5°C (Eisschrank) bestimmt. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Aus der Tabelle geht hervor, daß das Kathepsin des Endo-

Tabelle 1. Stabilität des Endometriumkathepsins

A Vers. Nr.	B Prot. Nr.	C Ges. N	D (K. E.) ^{Hb} 1. Bestimmung	E Zeit nach 1. Bestimmung	F (K. E.) ^{Hb} 2. Bestimmung
1	812/55	1,435	148	6 h	144
2	797/55	1,030	23	17 h	28
3	796/55	2,350	227	24 h	225
4	792/55	3,310	222	24 h	230
5	769/55	0,996	45	48 h	42
8	812/55	1,435	148	7 Tg.	137
6	720/55	1,840	167	5 Tg.	145
7	820/55	1,250	122	6 Tg.	110
9	812/55	1,435	148	27 Tg.	86

A = Versuchsnummer; B = Protokollnummer; C = Gesamt-N/ml Enzymlösung; D = Kathepsinaktivität bei der 1. Bestimmung; E = Zeit nach der 1. Bestimmung, Aufbewahrung bei 5°C; F = Kathepsinaktivität bei der 2. Bestimmung

metriums sehr stabil ist. Erst nach etwa 1 Woche macht sich ein geringer Aktivitätsabfall bemerkbar, nach etwa 4 Wochen sind noch etwa 60 % der ursprünglichen Aktivität nachweisbar.

Temperaturoptimum des Endometriumkathepsins

Zur Ermittlung des Temperaturoptimums des Endometriumkathepsins wurde im Standardansatz die Proteolyse durch Endometriumhomogenat (End. Nr. 493/56) mit Hämoglobin als Substrat bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Aus der Abb. 1 geht hervor, daß das Hämoglobin durch Endometriumkathepsin optimal um 40 ° gespalten wird.

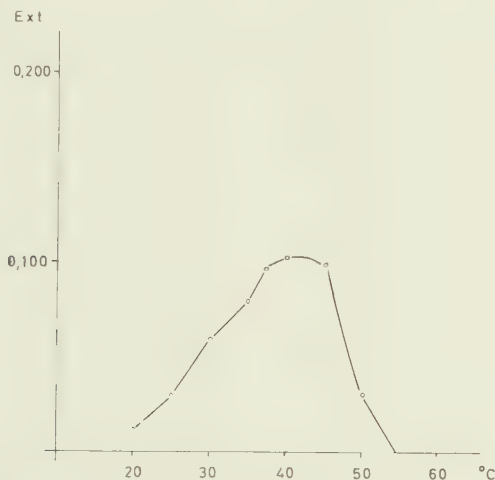


Abb. 1. Temperaturoptimum des Endometriumkathepsins. Ordinate: Extinktion des Trichloressigsäurefiltrates. Abszisse: Temperatur (° Celsius). Standardansatz. Gewebekonzentration 10%, pH 3,5 Azetat-Ammoniumsulfatpuffer. Inkubation 10 Min. bei 37°

Zeitlicher Verlauf der Hämoglobinspaltung durch Endometriumkathepsin

Um den zeitlichen Verlauf der Hämoglobinspaltung festzustellen, wurde Endometrium unter Standardbedingungen verschieden lange inkubiert.

Die ermittelten Extinktionswerte des Trichloressigsäurefiltrates sind in Abb. 2 in Abhängigkeit von der Spaltungszeit graphisch dargestellt. Aus der Abbildung geht hervor, daß die Spaltung in den ersten 45 Min. nahezu linear verläuft.

Abhängigkeit der Hämoglobinspaltung durch Endometriumhomogenat von der Enzymkonzentration

Um die Abhängigkeit der Hämoglobinspaltung von der Enzymkonzentration zu untersuchen, wurden verschieden stark verdünnte Endometriumhomogenate im Standardansatz 10 Min. inkubiert. Die erhaltenen E-Werte sind in Abb. 3 in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration aufgetragen.

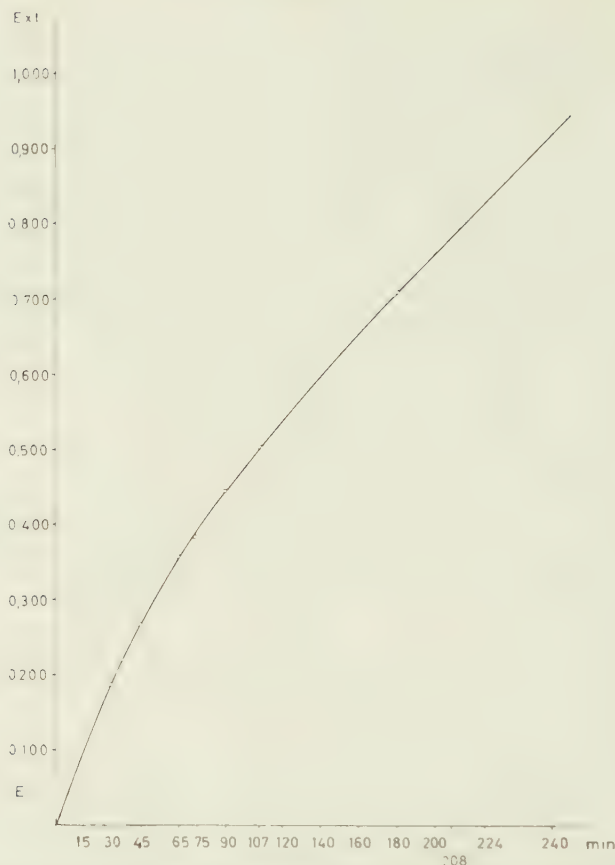


Abb. 2. Zeitlicher Verlauf der Hämoglobinspaltung durch Endometrium. Ordinate: Extinktion des Trichloressigsäurefiltrates. Abszisse: Zeit in Minuten. Standardansatz. Gewebekonzentration 10% Homogenat. Inkubation 37

Aus der Abbildung geht hervor, daß die Hämoglobinspaltung über einen weiten Bereich der Enzymkonzentration proportional ist.

Kathepsinaktivität im Endometrium während verschiedener Zyklusphasen

Gewählte Versuchsbedingungen:

Aktivitätsbedingungen 6—8 Stunden nach Materialentnahme. Standardansatz s. S. 172
Inkubation 37°. Gewebekonzentration 10% = 0,1 g/ml Enzymlösung.

Aktivität ausgedrückt in Kathepsineinheit = (K.E.)^{Hb} (s. S. 173)

Spezifische Aktivität: = (K.E.) $\frac{\text{Hb}}{\text{Ges. N}}$
Ges N/ml Enzymlösung (s. S. 171).

An 66 Endometrien aller Zyklusphasen wurde die Kathepsinaktivität bestimmt. Die Einteilung in einzelne Gruppen geschah nach dem bekannten histologischen Bild in fast völliger Übereinstimmung mit den Zyklustagen. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt. In jeder Gruppe wurde der Mittelwert für die spezifische Aktivität und die

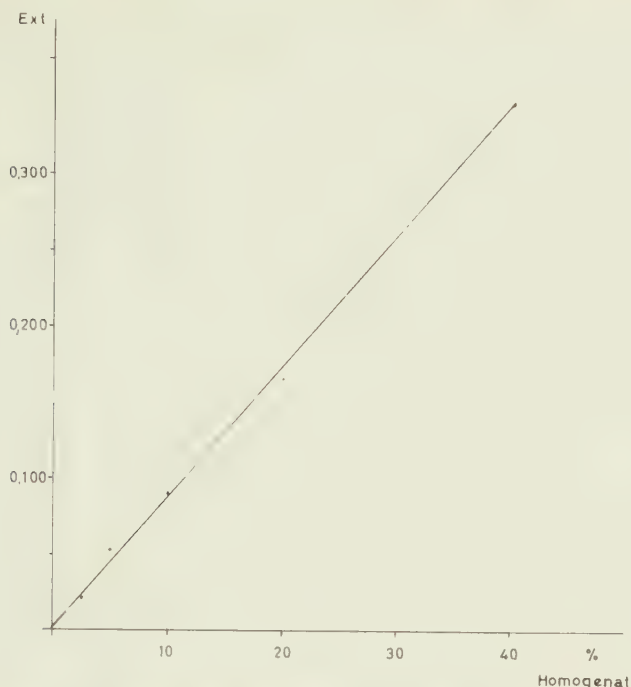


Abb. 3. Abhängigkeit der Hämoglobinspaltung von der Enzymkonzentration. Ordinate: Extinktion des Trichloressigsäurefiltrates. Abszisse: Enzymkonzentration in % Homogenat. Standardansatz. Gewebekonzentration variiert. Inkubation 10 Min. bei 37°

mittlere Abweichung der Mittelwerte errechnet. Zwischen der Proliferationsphase (73.47 ± 3.64), frühen Sekretions- (73.84 ± 6.94) und späten Sekretionsphase (69.98 ± 6.66) besteht kein Aktivitätsunterschied. Dagegen war im Beginn der Sekretionsphase mit dem besonderen histologischen Kriterium der subnukleären Vakuolenbildung die spezifische Aktivität mit 94.28 ± 8.08 erhöht.

Tabelle 2. Endometrium der Proliferation 1.—14. Tag
Kathepsin

A Vers. Nr.	B Prot. Nr.	C Gew. d. Mat.	D Alter d. Pat.	E Klinische Diagnose	F Ges. N	G (K.E.) ^{Hb} · 10 ³	H (K.E.) ^{Hb} Ges. N · 10 ³
1	1526/55	Op.	46	Ut. my	1,820	121	66,49
2	1381/55	Op.	41	Ut. my.	1,860	202	108,6
3	884/55	Op.	34	Doppels. Ovarialtumoren	1,319	96	72,78
4	877/55	Op.	46	Zyst. Adnextumor	1,300	110	84,62
5	951/55	Op.	44	Ut. my.	1,320	120	90,90
6	1525/55	Op.	46	sog. Oberflächen-Ca.	1,665	110	66,07
7	1465/55	Op.	51	Ut. my.	1,736	112	64,52
8	1498/55	Op.	43	Ut. my.	1,372	107	77,99
9	721/55	Op.	44	Zyst. Ovar, Ut. my.	1,372	65	44,38
10	337/56	Op.	40	Endometriose	1,344	89	66,22
11	199/56	Op.	37	Kollum-Ca. beg.	1,750	110	62,86

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tabelle 2

A Vers. Nr.	B Prot. Nr.	C Gew. d. Mat.	D Alter d. Pat.	E Klinische Diagnose	F Ges. N	G (K. E.) ^{Hb} · 10 ³	H (K.E.) ^{Hb} Ges. N · 10 ³
12	369/55	Op.	45	Ut. my.	1,350	115	85,19
13	357/55	Op.	55	Ut. my.	1,310	107	81,68
14	1177/56	Op.	41	Kollum-Ca.	1,570	117	74,52
15	490/56	Op.	43	Ut. my.	1,765	72	40,79
16	625/56	Op.	49	Ut. my.	1,905	159	83,46
17	712/56	Op.	36	Adnextumor, Endometriose	1,525	157	102,95
18	686/56	Op.	31	Kollum-Ca.	1,485	212	142,76
19	773/56	Op.	36	Ut. my.	1,694	106	62,57
20	781/56	Op.	35	Menorrhag.	1,652	93	56,29
21	787/56	Op.	45	Adnextumor	1,652	115	69,61
22	1428/55	Abr.	26	Polymenorrhoe	1,319	75	56,86
23	947/55	Abr.	30	Menorrhagien	1,344	93	69,20
24	912/55	Abr.	33	Zervixpolyp	1,288	175	135,9
25	893/55	Abr.	46	Portioerosion	1,327	81	61,04
26	891/55	Abr.	35	Ektropium	1,106	102	92,22
27	796/55	Abr.	17	Zervixpolyp Portioerosion	1,310	79	60,30
28	792/55	Abr.	29	Portioerosion	1,300	74	56,92
29	767/55	Abr.	47	Portioerosion	0,840	78	92,86
30	396/55	Abr.	35	Portioerosion	1,250	81	64,80
31	1203/55	Abr.	41	Ut. my.	1,500	136	90,67
32	976/56	Op.	47	Kollum-Ca.	1,595	128	80,25
33	1018/56	Op.	47	Menorrhagien	1,625	70	43,08
34	902/56	Op.	43	Ut. my.	1,665	118	70,87
35	850/56	Op.	46	Endometriose	1,875	82	43,73
36	846/56	Op.	45	Endometriose	1,610	100	62,11
37	789/56	Op.	42	Ut. my.	1,274	46	36,11
38	947/56	Op.	49	Ut. my.	1,290	87	67,44

$$M = 73,47 \pm 3,64$$

Endometrium im Beginn der Sekretion (subnukleäre Vakuolenbildung)

Kathepsin

1	1503/55	Op.	41	Adnextumor	1,815	160	88,15
2	181/56	Op.	41	Kollum-Ca.	1,805	162	89,75
3	115/56	Op.	45	Ut. my.	1,456	109	74,86
4	1427/55	Op.	41	Ut. my.	1,765	228	129,18
5	199/56	Op.	37	Kollum-Ca.	1,750	115	65,71
6	1280/56	Op.	39	Desmoidzysten beiderseits	1,205	100	82,99
7	766/55	Abr.	30	Polymenorrhoe	0,910	125	137,36
8	246/56	Op.	31	Kollum-Ca.	1,310	130	99,24
9	880/55	Abr.	43	Zervix-Polyp	1,300	105	80,77

$$M = 94,28 \pm 8,08$$

Endometrium frühe Sekretion 20.—24. Tag

Kathepsin

1	878/55	Op.	45	Ut. my.	1,800	122	67,78
2	950/55	Op.	42	Ut. my.	1,300	97	74,61
3	1140/55	Abr.	35	Funkt. Blutungsstörung	1,350	95	70,37
4	360/56	Abr.	33	Zervixpolyp	1,966	110	55,95
5	281/55	Abr.	26	Portioerosion	1,350	105	77,78
6	1240/55	Op.	44	Ut. my.	0,897	100	111,48
7	705/56	Op.	47	Ut. my., Korpus-Ca.	1,315	77	58,55

$$M = 73,84 \pm 6,94$$

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tabelle 2

Endometrium späte Sekretion 24.—28. Tag

Kathepsin

A Vers. Nr.	B Prot. Nr.	C Gew. d. Mat.	D Alter d. Pat.	E Klinische Diagnose	F Ges. N	G (K.E.) ^{Hb} · 10 ³	H (K.E.) ^{Hb} Ges. N · 10 ⁴
1	377/56	Op.	41	Kollum-Ca.	1,500	119	79,33
2	938/55	Abr.	28	Portioerosion	1,204	116	96,35
3	788/55	Abr.	32	Funkt. Blutungsstörung	1,274	40	31,40
4	769/55	Abr.	24	Funkt. Menorrhagien	0,996	45	45,19
5	765/55	Abr.	28	Menorrhagien	1,090	82	75,23
6	479/56	Op.	47	Ut. my.	2,630	181	68,82
7	494/56	Op.	51	Ut. my.	1,765	150	84,99
8	509/56	Abr.	39	Kolpitis	2,225	110	49,44
9	699/56	Op.	48	Ut. my.	1,415	148	104,59
10	839/56	Op.	34	Ut. my.	1,580	78	49,37
11	845/56	Op.	35	Endometriose	1,485	140	94,28
12	942/56	Op.	44	Ut. my.	1,525	93	60,98

$$M = 69,98 \pm 6,66$$

A = Versuchsnummer; B = Protokollnummer; C = Gewinnung des Materials; Operation oder Abrasio; D = Alter der Patientin; E = klinische Diagnose; F = Gesamt-N pro ml Enzymlösung;

G = (Kathepsineinheit) $\frac{Hb}{Ges. N} \cdot 10^3$; Definition s. S. 173; H = (Kathepsineinheit)

$\frac{Hb}{Ges. N} \cdot 10^3$ = spezifische Aktivität, Definition s. S. 173

Nach dem t-Verfahren ist bei $n_1 = n_2 = 2 = 45$ der Anstieg der Aktivität im Beginn der Sekretionsphase mit $t = 2,13$ als wahrscheinlich zu bezeichnen, d. h. eine statistische Sicherung wäre bei einer größeren Fallzahl möglich.

Kathepsinaktivität in der Graviditätsdecidua

Die Aktivität in der Graviditätsdecidua (Tab. 3) ist mit $(K.E.) \frac{Hb}{Ges. N} 50,40 \pm 6,35$ wahrscheinlich geringer als im proliferierenden und sezernierenden Endometrium.

Kathepsinaktivität bei pathologischen Zustandsbildern des Endometriums

Im Endometrium bei glandulär-zystischer Hyperplasie (Tab. 4) ist die Fermentaktivität signifikant mit $108,32 \pm 9,44$ gegenüber dem normalen Endometrium erhöht. Beim Korpus-Ca. fand sich kein sicherer Unterschied. Beim atrophischen Endometrium mit fehlender Drüsenproliferation bei hormonaler Insuffizienz ist die spezifische Kathepsinaktivität signifikant mit $28,27 \pm 4,03$ erniedrigt. Beim irregulären Endometrium mit unterschiedlichen histologischen Bildern (gemischtes Schleimhautbild, Endometritis, verzögerte Anstoßung u. a.) schwankte die Fermentaktivität.

Tabelle 3. Graviditätsdecidua

Kathepsin

A Vers. Nr.	B Prot. Nr.	C Gew. d. Mat.	D Alter d. Pat.	E Klinische Diagnose	F Ges. N	G (K.E.) ^{Hb} · 10 ³	H (K.E.) ^{Hb} Ges. N · 10 ³
1	1394/55	Op.	38	Grav. Mens II-III (Föt 4 cm lang)	1,806	135	74,75
2	1523/55	Op.	34	Grav. Mens II	1,350	63	46,67
3	118/56	Op.	35	Extrauterine Gravidität	1,470	88	59,86
4	1484/55	Abr.	35	Abort Mens III (teilnekrot.)	1,760	78	44,32
5	791/55	Abr.	27	Abort Mens II-III (teilnekrot.)	1,350	37	27,41
6	746/55	Abr.	37	Abort Mens I-II (regr. Veränderungen)	1,580	109	68,99
7	174/56	Abr.	48	Abort Mens II (regr. Veränderungen)	1,890	48	25,40
8	197/56	Abr.	44	Abort Mens I-II (frische Decidua)	1,595	89	55,80

$$M = 50,40 \pm 6,354$$

A = Versuchsnummer; B = Protokollnummer; C = Gewinnung des Materials: Operation oder Abrasio; D = Alter der Patientin; E = klinische Diagnose; F = Gesamt-N pro ml Fenzymlösung.

$$G = (\text{Kathepsineinheit}) \cdot 10^3; H = (\text{Kathepsineinheit}) \cdot \frac{\text{Hb}}{\text{Ges. N}} \cdot 10^3$$

Tabelle 4.

Atrophisches Endometrium

Kathepsin

A Vers. Nr.	B Prot. Nr.	C Gew. d. Mat.	D Alter d. Pat.	D Klinische Diagnose	F Ges. N	G (K.E.) ^{Hb} · 10 ³	H (K.E.) ^{Hb} Ges. N · 10 ³
1	861/55	Abr.	45	Präklimakt. Blutungsstörg.	0,756	18	23,81
2	858/55	Abr.	24	Funkt. Blutungsstörung (Dauerblutung)	1,029	49	47,62
3	862/55	Abr.	43	Zervixpolyp	1,519	20	13,25
4	857/55	Abr.	47	Ut. my.	0,900	37	41,11
5	813/55	Abr.	45	Klimakt. Blutungsstörung	1,310	17	13,08
6	811/55	Abr.	56	Blutungsstörung	1,300	30	23,08
7	797/55	Abr.	47	Präklimakt. Blutungsstörg.	1,030	28	26,21
8	210/55	Op.	35	Subm. Myom	1,310	34	25,95
9	1272/55	Abr.	50	Klimakt. Blutungsstörung	1,350	57	42,22

$$M = 28,27 \pm 4,03$$

Glandulär-zystische Hyperplasie

Kathepsin

1	1507/55	Abr.	45	Dauerblutung	1,595	150	94,04
2	750/55	Op.	50	Korpuspolyp	1,300	167	128,67
3	722/55	Abr.	47	Präklimakt. Blutungsstörg.	1,370	109	79,57
4	720/55	Abr.	57	Präklimakt. Blutungsstörg.	1,310	167	127,5
5	812/55	Abr.	47	Präklimakt. Blutungsstörg.	1,435	149	103,8
6	859/55	Abr.	43	Präklimakt. Blutungsstörg.	1,092	120	118,6
7	860/55	Abr.	41	Präklimakt. Blutungsstörg.	1,231	107	86,92
8	399/56	Abr.	40	Ut. my.	1,600	174	108,72
9	615/56	Op.	44	Ut. my.	1,750	158	90,28
10	814/56	Abr.	46	Aden. Hyperpl.	1,092	185	182,81
11	727/56	Op.	49	Prol., maß. Hyperlasie	1,765	125	70,82

$$M = 108,32 \pm 9,445$$

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tabelle 4

Irreguläres Endometrium

Kathepsin

A Vers. Nr.	B Prot. Nr.	C Gew. d. Mat.	D Alter d. Pat.	E Klinische Diagnose	F Ges. N	G (K.E.) ^{Hb} · 10 ³	H (K.E.) ^{Hb} Ges. N · 10 ³
1	763/55	Abr.	45	Irregul. Hyperplasie Endometrium	1,330	35	26,31
2	764/55	Abr.	41	Prolif., stellenweise Hyperplasie	1,115	70	62,78
3	768/55	Abr.	46	Irreg. gemischtes Schleimhautbild	0,715	35	48,95
4	865/55	Abr.	48	Korpuspolyp	1,330	83	62,41
5	812/55	Abr.	47	Klim. Blutungsstörung teilw. Sekr.	1,300	152	116,92
6	783/55	Abr.	40	Endometr. p. Abortum	1,313	120	91,39
7	828/55	Abr.	24	Endometr. p. Abortum	1,029	49	47,62
8	493/56	Op.	37	Irreg. Endometrium	1,202	87	72,38
9	584/56	Op.	51	Verzögerte Abstoß., geschw. Drüsen unmittelbar nach Menstruation	2,240	173	77,20

$$M = 77,33$$

Korpuskarzinom, andere Tumoren

Kathepsin

1	1009/56	Op.	48	Adeno-Ca.	2,210	168	76,02
2	442/56	Op.	60	Adeno-Ca.	1,305	83	63,60
3	259/56	Op.	45	Adeno-Ca.	1,485	169	113,8
4	829/55	Abr.	48	Adeno-Ca.	1,030	70	67,96
5	534/56	Op.	37	Endometrium-Sa	3,680	235	63,86

$$M = 77,05 \pm 9,449$$

A = Versuchsnummer; B = Protokollnummer; C = Gewinnung des Materials; Operation oder Abrasio; D = Alter der Patientin; E = klinische Diagnose; F = Gesamt-N pro ml Enzymlösung;
 $G = (\text{Kathepsineinheit}) \frac{\text{Hb}}{\text{Ges. N}} \cdot 10^3$; $H = (\text{Kathepsineinheit}) \frac{\text{Hb}}{\text{Ges. N}} \cdot 10^3$

b) Myometrium

Gewählte Versuchsbedingungen wie beim Endometrium

Die reaktionskinetischen Untersuchungen zeigen, daß die Hydrolyse des Hämoglobins durch Muskelextrakt wie beim Endometrium unter den gewählten Versuchsbedingungen völlig proportional der Zeit und der Enzymkonzentration erfolgt. Auf eine Darstellung der Kurven wird verzichtet.

Die Ergebnisse von 10 Aktivitätsbestimmungen sind in Tab. 5 dargestellt. Aus ihr geht hervor, daß im Myometrium eine wesentlich geringere Kathepsinaktivität $(K.E.) \frac{\text{Hb}}{\text{Ges. N}} = 24,17 \pm 2,64$ als im Endometrium vorhanden ist. Der Unterschied ist statistisch gesichert. In einem sogenannten roten Myom ließ sich keine Aktivität nachweisen.

Tabelle 5. Myometrium

Kathepsin

A Vers. Nr.	B Prot. Nr.	C Gew. d. Mat.	D Alter d. Pat.	E Klinische Diagnose	F Ges. N	G (K. E.) ^{Hb} · 10 ³	H (K. E.) ^{Hb} Ges. N · 10 ³
1	1949/55	Op.	43	Dauerblutung bei Ut. mv.	1,360	12	8,82
2	1298/55	Op.	44	Zervix-Ca.	1,500	48	32,0
3	1248/55	Op.	45	Blasenmole	1,680	30	17,9
4	108/55	Op.	26	Kollum-Ca. I	1,360	50	36,8
5	1240/55	Op.	44	Ut. my.	1,300	34	26,2
6	1177/55	Op.	41	Kollum-Ca. I	2,030	46	22,7
7	369/55	Op.	45	Ut. my.	1,960	52	26,5
8	364/55	Op.	43	Ovar l p k links	1,800	44	24,4
9	548/56	Op.	43	Ut. my.	0,965	15	15,5
10	1339/55	Op.	46	Zervixpolyp	2,200	68	30,9

$$M = 24,17 \pm 2,64$$

Kollumkarzinom

Kathepsin

1	976/56	Op.	47	Plattenepithel-Ca.	1,595	75	47,02
2	931/56	Op.	23	Plattenepithel-Ca.	2,590	228	88,03
3	1523/55	Op.	34	Plattenepithel-Ca.	1,715	171	99,71
4	831/55	Op.	64	Plattenepithel-Ca.	1,400	120	85,71

$$M = 80,12 \pm 11,45$$

A = Versuchsnummer; B = Protokollnummer; C = Gewinnung des Materials: Operation oder Abrasio; D = Alter der Patientin; E = klinische Diagnose; F = Gesamt-N pro ml Enzymlösung;

$$G = (\text{Kathepsineinheit}) \frac{\text{Hb}}{\text{Ges. N}} \cdot 10^3; H = (\text{Kathepsineinheit}) \frac{\text{Hb}}{\text{Ges. N}} \cdot 10^3$$

c) Kollum-Karzinom (histol. Plattenepithel-Ca.) (Tab. 5):

Bei 4 Untersuchungen $(K.E.) \frac{\text{Hb}}{\text{Ges. N}} = 80,12 \pm 11,45$ ergibt sich gegenüber dem Endometrium keine sichere Differenz.

d) Ovar

Die Hämoglobinhidrolase durch Corpus-luteum-Homogenat verläuft unter den gewählten Versuchsbedingungen proportional der Zeit und der Enzymkonzentration. In Tab. 6 sind die Untersuchungsergebnisse am Ovarialgewebe ohne Corpus luteum, an Menstruations- und Schwangerschaftsgelbkörper zusammengestellt.

Das Corpus luteum besitzt von allen untersuchten Geweben der weiblichen Genitalorgane die höchste Kathepsinaktivität. Bei 12 Untersuchungen ist die Aktivität im Menstruationsgelbkörper signifikant höher $(K.E.) \frac{\text{Hb}}{\text{Ges. N}} = 113,88 \pm 7,47$ als im Endometrium und als im Ovarrestgewebe $(57,30 \pm 3,23)$. Während der Gravidität steigt die Aktivität im Gelbkörper an. Dieser Anstieg der Kathepsinaktivität $(151,86 \pm$

Tabelle 6. Ovarialgewebe (ohne Corpus luteum)

Kathepsin

A Vers. Nr.	B. Prot. Nr.	C Gew. d. Mat.	D Alter d. Pat.	E Klinische Diagnose	F. Ges. N	G (K. E.) ^{Hb} · 10 ³	H (K. F.) ^{Hb} Ges. N · 10 ³
1	1523/55	Op.	34	Gravidität II-III (E. U.)	1,058	55	28,30
2	1367/55	Op.	36	Gravidität II-III (E. U.)	1,360	68	50,00
3	1427/55	Op.	41	Ut. my.	1,460	80	54,79
4	1526/55	Op.	45	Ut. my.	1,380	87	63,04
5	115/56	Op.	45	Ut. my. Menorrh.	1,500	100,0	66,67

$$M = 57,3 + 3,229$$

Ovarialkarzinom

1	403/56	Op.	51	Adeno-Ca.	1,764	139	78,80
---	--------	-----	----	-----------	-------	-----	-------

Corpus luteum menstruationis

1	1427/55	Op.	41	ca. 1.-4. Tag, Endometrium intranukl. Vakuolen	1,710	245	143,27
2	1526/55	Op.	45	1.-4. Tag	1,820	252	138,46
3	115/56	Op.	45	1.-4. Tag, Endometrium subn. Vakuolen	1,524	194	127,30
4	199/56	Op.	37	1.-4. Tag, Endometrium subn. Vakuolen	2,100	193	91,90
5	181/56	Op.	41	1.-4. Tag, Endometrium beg. Sekretion	2,045	180	88,02
6	331/56	Op.	35	1.-4. Tag	1,816	171	94,16
7	1380/56	Op.	42	ca. 10. Tag, Endometrium Sekretionsmitte	2,220	170	76,58
8	1240/55	Op.	44	ca. 10. Tag, Endometrium Sekretionsmitte	1,092	145	132,79
9	543/56	Op.	27	ca. 21. Tag, (Menst.) Zykl. v. 24 Tagen	1,680	166	98,81
10	479/56	Op.	47	26. Tag bei 28täg. Zyklus	1,090	140	128,44
11	845/56	Op.	35	Ende Menstruationszyklus	0,870	137	157,47
12	947/56	Op.	44	1.-4. Tag, Endometrium noch Proliferation	1,900	180	94,74

$$M = 113,88 + 7,47$$

Corpus luteum graviditatis

Kathepsin

1	1523/55	Op.	34	Grav. Mens II-III (E. U.)	2,325	352	151,40
2	1367/55	Op.	36	Grav. Mens II-III (E. U.)	2,296	300	130,66
3	1248/55	Op.	45	Blasenm. (Grav. Mens III-IV)	1,482	210	141,7
4	1197/55	Op.	30	Grav. Mens I-II. (E. U.)	1,150	210	182,6
5	195/56	Op.	29	Grav. Mens II-III (E. U.)	2,020	270	133,7
6	417/56	Op.	30	Grav. Mens I-III (E. U.)	1,850	290	156,8
7	811/56	Op.	35	Grav. Mens II	1,680	279	166,1

$$M = 151,86 + 6,98$$

A = Versuchsnummer; B = Protokollnummer; C = Gewinnung des Materials: Operation oder Abrasio; D = Alter der Patientin; E = klinische Diagnose; F = Gesamt-N pro ml Enzymlösung;
 $G = (\text{Kathepsineinheit})^{\text{Hb}} \cdot 10^3$; $H = (\text{Kathepsineinheit})^{\frac{\text{Hb}}{\text{Ges. N}}} \cdot 10^3$

Tabelle 7
Plazenta Mens I—III (IV)

Kathepsin

A Vers. Nr.	B Prot. Nr.	C Gew. d. Mat.	D Alter d. Pat.	E Klinische Diagnose	F Ges. N	G (K. E.) ^{Hb} · 10 ³	H (K. E.) ^{Hb} Ges. N · 10 ³
1	417/56	Op.	30	Grav. Mens I-II (E. U.)	0,755	131	173,6
2	1523/55	Op.	34	Grav. Mens II, Kollum-Ca.	0,910	126	138,5
3	1394/55	Op.	38	Grav. Mens II-III, Kollum-Ca.	1,190	123	103,4
4	529/56	Op.	37	Grav. Mens I-II, (Extrakt. Grav.)	1,030	81	78,64
5	376/56	Abr.	42	Abort Mens II, regr. Veränderung	1,105	80	72,40
6	1484/55	Abr.	35	Abort Mens II-III, Zotten blas. deg.	0,813	70	86,10
7	820/55	Abr.	31	Abort Mens II-III, Zotten ohne regr. Veränd.	1,250	105	84,00
8	751/55	Ausr.	27	Abort Mens II, Leukoz. Inf.	1,250	50	40,00
9	746/55	Ausr.	37	Zotten regr. verändert Abort Mens I-II, Zotten regr. verändert	2,010	206	102,5
10	564/56	Ausr.	36	Abort Mens I	0,855	111	130,0
11	899/56	Ausr.	27	Abort Mens II	1,345	138	102,6
12	172/56	Ausr.	24	Abort Mens III-IV	1,485	133	89,56
13	170/56	Ausr.	21	Abort Mens III-IV	1,580	92	58,23
14	169/56	Ausr.	18	Abort Mens III-IV	1,300	88	67,69

$$M = 94,80 \pm 11,0$$

Plazenta Mens IX—X

A Vers. Nr.	B Prot. Nr.	C Gew. d. Mat.	E Klinische Diagnose	F Ges. N	G (K. E.) ^{Hb} · 10 ³	H (K. E.) ^{Hb} Ges. N · 10 ³
1	146	Geburt	Plazenta M. IX	1,345	87	64,68
2	147	Geburt	Plazenta M. IX	1,805	35	19,39
3	148	Geburt	Plazenta M. IX	1,720	63	36,62
4	149	Geburt	Plazenta M. IX	2,400	40	16,67
5	150	Geburt	Plazenta M. IX	2,122	58	27,33
6	6	Geburt	Plazenta M. IX	1,350	60	44,44
7	5	Geburt	Plazenta M. IX	1,800	45	25,00
8	7	Geburt	Plazenta M. IX	2,500	78	31,20
9	8	Geburt	Plazenta M. IX	2,600	96	36,92
10	9	Geburt	Plazenta M. IX	2,300	81	35,22
11	10	Geburt	Plazenta M. IX	2,880	129	44,79
12	44	Geburt	Plazenta M. IX	0,950	45	47,37
13	51	Geburt	Plazenta M. IX	1,100	30	27,27
14	52	Geburt	Plazenta M. IX	1,190	40	33,61
15	120	Geburt	Plazenta M. IX	1,568	31	26,15
16	121	Geburt	Plazenta M. IX	1,564	56	35,80

$$M = 34,53 \pm 2,97$$

A = Versuchsnummer; B = Protokollnummer; C = Gewinnung des Materials; Operation oder Abrasio; D = Alter der Patientin; E = klinische Diagnose; F = Gesamt-N pro ml Enzymlösung;

$$G = (\text{Kathepsineinheit})^{\text{Hb}} \cdot 10^3; H = (\text{Kathepsineinheit}) \frac{\text{Hb}}{\text{Ges. N}} \cdot 10^3$$

6,98) läßt sich gerade eben noch sichern. In der Follikelflüssigkeit und im Inhalt der serösen Zysten konnten freie 280 m μ absorbierende Aminosäuren gefunden werden. Die UV-Spektrophotometrische Bestimmungsmethode konnte deshalb nicht verwendet werden.

Plazenta

Die Spaltung von Hämoglobin durch Plazentargewebe verläuft unter den gewählten Versuchsbedingungen proportional der Zeit und der Enzymkonzentration. Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen von Plazenten verschiedener Altersstufen [Frühgravidität M I-III (IV)] und Ende der Schwangerschaft (M X) sind in Tab. 7 zusammengefaßt. Die Kathepsinaktivität der frühen Plazenta (K.E.) $\cdot \frac{\text{Hb}}{\text{Ges. N}} = 94,80 \pm 11,0$ ist gegenüber dem Endometrium ($73,47 \pm 3,64$) nicht signifikant erhöht. Im Verlauf der Schwangerschaft sinkt die Kathepsinaktivität in der Plazenta ab. Am Ende der Gravidität beträgt die Aktivität nur noch (K.E.) $\cdot \frac{\text{Hb}}{\text{Ges. N}} = 34,53 \pm 2,97$, ist also signifikant geringer als in der frühen Gravidität. Die Aktivität der Spätplazenta (Mens X) ist im Gegensatz zur frühen Plazenta signifikant niedriger als die des Endometriums.

4. Diskussion

Unsere Untersuchungen ergaben, daß in allen untersuchten Geweben eine Kathepsinaktivität festzustellen ist. Dabei verlief die Spaltung des Hämoglobins durch Endometriumhomogenat und durch andere Gewebe der Genitalorgane in der Anfangszeit des Versuches völlig linear. Tyrosin und Tryptophan, deren Absorption spektrophotometrisch erfaßt wird, werden im allgemeinen bevorzugt aus dem Proteinverband gelöst (70). Bei kurzer Inkubationszeit wird vermutlich nur die zunächst einsetzende Proteolyse erfaßt, da nach Anson (3) die Wirkung der Peptidasen sekundär ist und sich mehr auf die aus dem Eiweißverband gelösten Spaltprodukte erstreckt.

Bei den Kathepsinaktivitätsbestimmungen am Endometrium läßt sich feststellen, daß im Beginn der Sekretionsphase mit dem histologischen Bild der subnukleären Vakuolenbildung die Fermentaktivität wahrscheinlich [t-Verfahren, Schelling (55)] erhöht ist. Eine statistische Sicherung wäre vielleicht bei großer Fallzahl möglich. Dieser Befund, der auch bei den Exopeptidasen wahrscheinlich zu machen war, deutet darauf hin, daß den eiweißspaltenden Fermenten in erster Linie eine Funktion im Eiweißstoffwechsel zukommt, die bei der Vorbereitung der Schleimhaut zur Eiaufnahme am größten ist und bei nicht erfolgter Befruchtung wieder eingeschränkt wird. Es erscheint so gut wie sicher, daß die eiweißspaltenden Fermente auch an der Eiweißsynthese beteiligt sind, wenn auch der Vor-

gang als solcher bei der vielgestaltigen Struktur der Eiweißstoffe noch nicht endgültig geklärt ist (72).

Im Gegensatz zu den Exopeptidasen [Fuhrmann, (24)] konnte am Endometrium in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Stark u. Vorherr (68) kein Anstieg der Endopeptidaseaktivität in der Sekretionsphase beobachtet werden. Auch in eigenen, unveröffentlichten Versuchen über die Endopeptidaseaktivität im alkalischen Milieu, auf deren ausführliche Beschreibung im Rahmen dieser Arbeit verzichtet werden soll, konnte

Tabelle 8

A Gewebe	B Anzahl der Untersuchungen	C $\frac{\text{Cas}}{\text{Ges. N}} \cdot 10^3$ (T. E.)	D $\frac{\text{Hb 7,6}}{\text{Ges. N}} \cdot 10^3$ (E. E.)
End. Proliferation 1.—14. Tag	20	3,64 - 0,561	121,8 - 10,13
Beginnende Sekretion, 24.—28. Tag	9	4,37 - 0,901	161,6 - 10,05
Späte Sekretion, 24.—28. Tag	32	3,76 - 0,592	123,4 - 17,43

A = Gewebe; B = Anzahl der Untersuchungen; C = Trypsineinheiten mg Gesamt-N in ml Enzymlösung Aktivitätsbestimmung spektrophotometrisch mit dem Substrat Casein 1%, 0,15 M Phosphatpuffer (nach Sørensen) pH 7,6. Methode s. Northrop, (Kristalline Enzymes, 1948); D = (Enzymeinheit) $\frac{\text{Hb 7,6}}{\text{Ges. N}}$ Spezifische Aktivität mg Gesamt-N/ml Enzymlösung. Aktivitätsbestimmung mit harnstoffdenaturiertem Hämoglobin bei pH 7,6. Methode Northrop (Kristalline Enzymes, 1948). Eine Enzymeinheit wird definiert als diejenige Menge von Enzym, die unter den gewählten Versuchsbedingungen in 7 ml Standardansatz bei einer Inkubationszeit von 10 Min. bei 37°C nach Abzug des Enzym-Substrat-Leerwertes einen Anstieg der optischen Dichte bei 280 m μ Wellenlänge (10 mm Schichtdicke) von 1000 verursacht

kein Fermentanstieg in der zweiten Zyklushälfte festgestellt werden (Tab. 8). Für diese Diskrepanz zwischen der Exo- und Endopeptidaseaktivität konnte noch keine befriedigende Erklärung gefunden werden. Ob die stärkere Gewebsverdünnung bei den Exopeptidaseaktivitätsbestimmungen mit einer eventuellen Ausschaltung von Inhibitoren oder allein die Tatsache, daß bei den Endopeptidaseuntersuchungen stets die Aktivität eines Enzymkomplexes bestimmt wird, eine Rolle spielt, sei dahingestellt.

Durch die Untersuchungsergebnisse werden die früheren Untersuchungsergebnisse von Halban u. Frankl (28), Aschner u. Frankl (17) und Caffier (11) in Frage gestellt. Diese Autoren schlossen aus ihren Untersuchungen, daß vor der Menstruation von den Uterusdrüsen ein proteolytisches Ferment („Trypsin“) sezerniert wird, damit die Schleimhaut tryptisch abgebaut werden kann. Durch Frankl u. Aschner (17) ist beim Abbau des Seidenpeptons durch Endometrium höchstwahrscheinlich nicht eine Trypsin-, sondern eine Exopeptidaseaktivität (Di- und Polypepti-

dasen) untersucht worden. Wenn in dieser Arbeit ein Anstieg der Fermentaktivität vor der Menstruation festgestellt wurde, so ist diese Beobachtung zweifellos richtig, denn es ist auf Grund der eigenen Untersuchungsergebnisse (F u h r m a n n, 24) sicher, daß die Exopeptidaseaktivität in der Sekretionsphase ansteigt.

Die Vorstellung der Sekretion eines proteolytischen Fermentes zum Zwecke der Abstoßung der Schleimhaut bedarf auf Grund der jetzt vorliegenden Erkenntnisse wohl einer gewissen Revision. Die Übereinstimmung mit dem histologischen Bild und mit der hormonalen Regulation läßt Funktion der eiweißspaltenden Fermente im Eiweißstoffwechsel zweifellos in den Vordergrund treten.

Tabelle 9. GG-Hydrolyse durch Leichenorgane

Organ	Spaltung (°/o) in 120'
Endometrium (proliferierend)	24
Myometrium	20
Leber	30
Niere	37
Milz	16
Pankreas	26

Sektion 36 Stunden post mortem. Sektionsbefund: 42jährige Frau mit multipler Sklerose. Todesursache: Lungenembolie. Aktivitätsbestimmungen 2 Stunden nach Entnahme der Organe. Methodik s. bei F u h r m a n n

Der Abbau der Schleimhaut vollzieht sich wahrscheinlich erst nach einer Nekrose, die vermutlich durch Gefäßdrosselung zustande kommt (39), unter Mitwirkung proteolytischer Fermente. Diese werden aber nicht ausschließlich zu diesem Zwecke produziert, wie es früher vielfach angenommen wurde (s. Einleitung). Auf die Wirkung der proteolytischen Fermente bei der Nekrose wird von M ü l l e r (43) in der zusammenfassenden Darstellung über den Zelltod hingewiesen. Nur die tote Zelle wird von zell-eigenen proteolytischen Fermenten angegriffen und schließlich aufgelöst (46). Das Endometrium besitzt einen äußerst lebhaften Stoffwechsel und dementsprechend ist die Fermentaktivität im Vergleich zu anderen Organen relativ hoch. Die schnelle Autolyse des Endometriums ist jedem Untersucher geläufig. Eine Übersicht über die Glyzylglyzinspaltung durch Leichenorgane gibt Tab. 9. Der Fermentreichtum des Endometriums könnte eine Erklärung dafür geben, warum sich der Schleimhautabbau im Vergleich zu Nekrosen anderer Organe relativ rasch, praktisch innerhalb von 2 Tagen vollzieht. Die Lösung der nekrotischen Funktionalis von der verbleibenden Basalis und der Zertrümmerung der Schleimhaut in kleinere Gewebstückchen wird vermutlich durch die Uteruskontraktionen gefördert.

dert. Am 3. Tag der Menstruation ist bereits Regeneration nachweisbar und normalerweise ist am 4. Tag das Kavum wieder völlig epithelisiert (66). Es ist anzunehmen, daß die Proteasen der Leukozyten und Lymphozyten (Übersicht s. b. Menkin), die bereits vor der Menstruation mehr oder weniger reichlich in der Schleimhaut festzustellen sind, beim Schleimhautabbau ebenfalls eine Rolle spielen. Weitere Untersuchungen darüber und insbesondere über die Aktivität proteolytischer Fermente im Menstrualblut sind im Gange.

An der Graviditätsdecidua konnte nur in wenigen Fällen eine Aktivitätsbestimmung der Endopeptidase vorgenommen werden. Dabei schien die Kathepsinaktivität geringer zu sein als im Endometrium.

Diese Befunde könnten daraufhin deuten, daß die proteolytische Fermenttätigkeit in der Schwangerschaftsdecidua geringer ist als im Endometrium zur Zeit der Sekretion. Es ist bei der Decidua aber eine besonders kritische Beurteilung nötig, da das zur Verfügung stehende Gewebematerial nur in wenigen Fällen einer Decidua entstammte, die einem schwangeren Uterus nach einer Uterusexstirpation entnommen werden konnte. Die anderen Untersuchungen wurden — wie auch bei anderen Autoren — an Gewebe durchgeführt, das bei Spontanaborten gewonnen wurde. Hierbei können aber grundsätzlich andere Verhältnisse vorliegen.

Die proteolytische Fermentaktivität in der Decidua besitzt deswegen besonders großes Interesse, weil ihre Funktion einerseits darin besteht, dem Ei einen geeigneten Nährboden zu geben (Übersicht s. Schmidt-Elmendorf, 56), ihr andererseits eine Schutzwirkung gegen das histolytische Vordringen des Trophoblasten zugeschrieben wird.

Graefenberg (26) vermutete 1910 ein Antiferment in der Decidua, das die proteolytische Kraft der Zotten hemmen sollte, andererseits wies Caffier (11) 1930 eine proteolytische Aktivität in der Decidua nach, die nach dem 2. Monat in der Kompakta bereits auf ein Minimum reduziert, während sie in der Spongiosa noch nach längerer Zeit nachweisbar sein sollte. In neuerer Zeit (1950) untersuchten Hamilton u. Mitarb. (29) die Proteolyse durch einen schwangeren Hundeuterus mit Deciduabildung am Substrat Kasein. Sie konnten keinen Anstieg der Fermentaktivität gegenüber einem nicht graviden Uterus finden. Die angeführten früheren Arbeiten müssen heute mit Kritik betrachtet werden, da sie mit der Müller-Jochmann-Serumplatte durchgeführt wurden. Hierbei ist das Ausmaß der getesteten Proteolyse nicht sicher abzugrenzen. Die proteolytische Aktivität in der Decidua und die Rolle der Decidua als Fermentinhibitor bedarf einer eingehenderen Untersuchung.

Die beim atrophischen Endometrium festgestellte signifikante Verminderung der Kathepsinaktivität einsprach ganz den Erwartungen,

da hier infolge hormonaler Störungen jegliches reguläre Endometriumwachstum vermißt wird. Dementsprechend findet man histologisch ein dichtes Stroma und funktionslose Drüsen. In Übereinstimmung hierzu stehen die Beobachtungen von Heinkel, Baumer u. Henning (30), die bei atrophischer Gastritis stets nur eine geringe Pepsin- und Kathepsinaktivität nachweisen konnten.

Im Gegensatz dazu war bei der glandulär-zystischen Hyperplasie, dem gesteigerten Endometriumwachstum, die Endopeptidaseaktivität gegenüber dem Endometrium der Proliferation erhöht. Der Aktivitätsanstieg ließ sich statistisch sichern. Eine Bestätigung findet sich bei Vorherr (68). Es besteht heute kein Zweifel darüber, daß die glandulär-zystische Hyperplasie in ihrer ganzen Variationsbreite durch einen verstärkten Östrogeneffekt (57, 58) hervorgerufen wird, wobei entscheidend bleibt, daß es nicht zur Ovulation mit Entwicklung eines Corpus luteum kommt. Wir sehen auch hier, daß die Fermentaktivität mit dem durch das Follikelhormon gesteigerten Wachstum des Endometriums parallel geht. Eine geringe Progesteronwirkung ist bei der glandulär-zystischen Hyperplasie nicht ausgeschlossen, wie man aus dem Vorkommen von Glykogen in den Drüsenepithelien annehmen kann (Übersicht s. bei Busany u. Undeutsch, 10). Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß Progesteron schon während der Follikelreifung gebildet wird. Die Möglichkeit, daß persistierende Follikel und Follikelzysten zeitweise Progesteron in geringen Konzentrationen zu bilden vermögen, ist deshalb nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen, da diese bis zur vollen Höhe ihrer inkretorischen Aktivität heranreifen.

Im Gegensatz zum Endometrium ist über die Aktivität der eiweißspaltenden Fermente im Myometrium, wie überhaupt an der Muskulatur, wenig bekannt. Caffier (11) fand Myometrium an der Müller-Jochmann-Platte inaktiv. Kogan (36) wies 1926 nach, daß der Antitrypsingehalt in den Uterusmyomen schwankt und glaubte daraus auf einen proteolytischen Prozeß in den Gewebeelementen des Fibromyoms schließen zu können.

Unsere vergleichende Untersuchungen über die Exopeptidasen in der Uterusmuskulatur (Fuhmann, 24) haben im Durchschnitt eine geringere Fermentaktivität als im Endometrium ergeben. Mit Hämoglobin als Substrat konnte eine signifikant niedrigere Kathepsinaktivität als im Endometrium ermittelt werden. Es ist also im Uterusmuskel sicher auch eine Endopeptidaseaktivität vorhanden. Das steht im Gegensatz zu den Feststellungen von Smith (59), der keine Hydrolyse der synthetischen Substrate für Kathepsin, Carbobenzoxylglycylphenylalanin, Carbobenzoxylisoglutamin, Benzoyl-l-argininamid und Carbobenzoxyl-l-glutamyl-l-Tyrosin durch Rattenmuskelextrakt fand. In eigenen Versuchen mit den synthetischen Substraten Carbobenzoxylglycylphenylalanin und Chloracetyltyrosin konnte bei pH 5,0 eine geringe Carboxypeptidaseaktivität festgestellt

werden. Auch K i e s u. S c h w i m m e r (35) berichten über ein Kathepsin im Kalbmuskel (Hämoglobin, pH 3,5). N a r d o n e (45) untersuchte die proteolytische Aktivität in Muskelproteinfraktionen und konnte feststellen, daß die Aktomysinfraktion eine pepsin- und kathepsinartige proteolytische Aktivität enthielt, während die aktomysinfreie Fraktion eine trypsinartige Enzymwirkung zeigte.

In weiteren vergleichenden Untersuchungen an Geweben der weiblichen Genitalorgane konnte gezeigt werden, daß im Corpus luteum eine hohe Endopeptidaseaktivität vorhanden ist, die unter den gleichen Versuchsbedingungen signifikant höher war als im Endometrium. Eine mögliche Erklärung dafür ist durch den hohen Ascorbinsäuregehalt des Corpus luteum (9, 25, 33) gegeben. Ascorbinsäure wirkt bekanntlich in ungereinigten Homogenaten als Aktivator des Kathepsins. Über die Exopeptidaseaktivität im Corpus luteum ist wegen der geringen Anzahl der Untersuchungen keine sichere Aussage möglich. Es scheint aber bei den Dipeptidasen im Corpus luteum kein wesentlicher Unterschied gegenüber dem Endometrium zu bestehen (F u h r m a n n, 24). Nur bei den Tripeptidasen scheint eine höhere Aktivität vorhanden zu sein. Dies würde mit dem Anstieg der Kathepsinaktivität gut übereinstimmen, denn im Kathepsinkomplex sind nach B e r g m a n n (6), T a l l a n u. F r u t o n, J o n e s (65) auch Tripeptidasen vorhanden. Die Endopeptidase-Fermentaktivität im Gelbkörper steigt während der Schwangerschaft an. Eine Parallelität ist hier mit dem Anstieg des Ascorbinsäuregehaltes und dem Aktivitätsanstieg anderer Enzymsysteme gegeben, denn nach B i d d u l p h, M e y e r, M c S h a n (8), S t a f f o r d (62) u. Mitarb. hängt die Aktivität der Adenosin-triphosphatase, Phosphatase, Succino- und Maleinsäuredehydrogenase sowie der Zytochromoxydase im Ovar eng mit dem Wachstum und der Entwicklung der Gelbkörper zusammen.

Die eiweißspaltenden Fermente in der Plazenta haben schon sehr früh Interesse gefunden, wie die größere Zahl älterer Arbeiten zeigt. Es konnte ein sicherer Unterschied in der Kathepsinaktivität zwischen der frühen und der späten Plazenta festgestellt werden. Wir können diese Feststellung, die auf Grund der früheren Arbeiten mit unzulänglicher Methodik immer noch fraglich war, mithin jetzt als gesicherte Tatsache betrachten, zumal sie in Übereinstimmung steht mit den Untersuchungen von S t a r k u. S i e b e r t (63) über die Kathepsinaktivität in Plazenten verschiedener Altersstufen. Dagegen ließ sich kein sicherer Unterschied in der Kathepsinaktivität zwischen dem Endometrium der Proliferation und der Aktivität in der frühen Plazenta feststellen, während ein solcher zwischen dem Endometrium und der späten Plazenta gesichert ist.

Da eiweißspaltende Fermente in allen Geweben des Körpers gefunden werden, berechtigt der Nachweis dieser Fermentgruppe in der Plazenta

nicht ohne weiteres dazu, der Plazenta verdauungsähnliche Funktionen zuzusprechen, wie es Hofbauer (31) 1905 getan hat. Es steht wohl fest, daß die Plazenta für die Zusammensetzung des fetalen Blutes von wesentlicher Bedeutung ist, und daß die Tätigkeit der Plazenta beim Austausch von Stoffen zwischen mütterlichem und fetalem Blut nicht allein durch Osmose und Diffusion erklärt werden kann, sondern daß sich auch in der Plazenta aktive Stoffwechselleistungen etwa im Sinne eines Umbaus vollziehen. Wajzer u. Zelnik (69) wiesen *in vitro* den Umbau von Glukose aus dem mütterlichen Blute in Fruktose durch Plazentagewebe nach. Man glaubt aber nicht, daß Proteine des mütterlichen Organismus in der Plazenta zerlegt werden, da im mütterlichen Blut genügend dialysable Aminosäuren zirkulieren, die durch die Plazenta hindurch diffundieren könnten. Hierfür sprechen auch die Ergebnisse von Bickenbach (7) u. a., die nach Glykokollbelastung von schwangeren Hunden einen fast gleichen Anstieg der Aminosäuren beim Feten fanden. Auch einfache Dipeptide überschreiten die Plazentaschranke. In neuerer Zeit hat man dagegen Befunde erhoben, die eine aktive Leistung der Plazenta im Sinne einer Anreicherung der Aminosäuren im fetalen Blut wahrscheinlich machen (12, 13). Es sind im Eiweißstoffwechsel der Plazenta noch viele Fragen ungeklärt, die einer Bearbeitung bedürfen, insbesondere ist der Nachweis der eiweißspaltenden Fermente in dem aus dem intervillösen Raum abströmenden Blut noch nicht erfolgt. Es scheint deshalb verfrüht, etwas über die mögliche Bedeutung der eiweißspaltenden Fermente in der Plazenta und über ihre Aktivitätsänderung während der Schwangerschaft auszusagen. Insbesondere ist die Rolle der Altersveränderungen, die mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen sind (42), nicht abzuschätzen.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Endopeptidaseaktivität (Kathepsinkomplex) im Endometrium und einer Reihe von anderen Geweben weiblicher Genitalorgane näher überprüft.

1. Bei 66 Endopeptidaseaktivitätsbestimmungen (Kathepsin) an normalen Endometrien verschiedener Zyklusphasen konnte in der Sekretionsphase keine statistisch gesicherte Erhöhung der Fermentaktivität gegenüber der Proliferationsphase gefunden werden. Ein Anstieg der Fermentaktivität in der beginnenden Sekretionsphase ist aber wahrscheinlich (t-Verfahren, Schelling).

2. Diese Ergebnisse sprechen im Gegensatz zu der Annahme früherer Untersucher nicht dafür, daß vor der Menstruation eigens ein besonderes eiweißspaltendes Ferment produziert bzw. im Endometrium bereitgestellt wird, um die Schleimhaut schnell abzubauen. Die hohe Aktivität im Funktionsmaximum der Schleimhaut, das zeitlich mit der Eiimplantation zusam-

menfällt, deutet darauf hin, daß den eiweißspaltenden Fermenten zur Hauptsache eine Aufgabe im Eiweißstoffwechsel zukommt. Dieser muß zur Zeit der Transformierung der Schleimhaut - in Übereinstimmung mit anderen Stoffwechseluntersuchungen - als besonders rege angesehen werden. Das Endometrium ist ein sehr fermentreiches Gewebe.

3. In der Decidua graviditatis scheint die Endopeptidaseaktivität geringer zu sein als beim Endometrium im Beginn der Sekretionsphase.

4. Beim übersteigerten Wachstum der Schleimhaut, histologisch als glandulär-zystische Hyperplasie erkennbar, ist die Endopeptidaseaktivität signifikant höher als im proliferierenden Endometrium. Dagegen ist beim atrophischen Endometrium die Kathepsinaktivität signifikant erniedrigt.

5. In vergleichenden Untersuchungen konnte erstmalig gezeigt werden, daß die Endopeptidaseaktivität im Myometrium unter den gleichen Versuchsbedingungen sehr viel geringer ist als im Endometrium.

6. Über die Fermentaktivität des Corpus luteum war uns bisher nichts bekannt. Das Corpus luteum weist unter den Geweben der weiblichen Genitalorgane unter den gleichen Versuchsbedingungen die höchste Kathepsinaktivität auf. Während der Schwangerschaft steigt die Fermentaktivität im Corpus luteum weiter an.

7. In der frühen Plazenta entspricht die Endopeptidaseaktivität etwa der des Endometriums. In der Spätplazenta ist die Fermentaktivität signifikant geringer als die des Endometriums und die der frühen Plazenta.

Schrifttum

1. Abe, M.: Jap. J. Obstetr. 1932, Bd. 15, S. 285. Ref. Ber. Gynäk. 1933, Bd. 24, S. 170. — 2. Anson, M. L., u. Mirsky, A.: J. gen. Physiol. 1932, Bd. 16, S. 59. — 3. Anson, M. L.: J. gen. Physiol. 1936/37, Bd. 20, S. 565. — 4. Arinstein, B.: Biochem. Z. 1926, Bd. 171, S. 15. — 5. Ascoli, A.: Zbl. Physiol. 1903, Bd. 16, S. 124. — 6. Bergmann, M.: Adv. Enzymologie 1942, Bd. 2, S. 49. — 7. Bickenbach, W.: Physiologie der Plazenta. In: Seitz, L., u. Anreith, A., Biologie und Pathologie des Weibes, Bd. VII, S. 219. Urban & Schwarzenberg 1952. — 8. Biddulph, C., Meyer, R. K., u. McShan, W. H.: Endocrinology 1949, Bd. 45, S. 222; Zit. n. Stuermer, V. N., u. Stein, R. J.: Am. J. Obstetr. Gynec. 1952, Bd. 63, S. 359. — 9. Biskind, G. R., u. Glick, D.: J. biol. Chem. 1936, Bd. 113, S. 27. — 10. Bussanny-Caspari, W., u. Undeutsch, D.: Arch. Gynäk. 1956, Bd. 188, S. 1. — 11. Caffier, P.: Münch. med. Wschr. 1930, Bd. 77, S. 389. — 12. Christensen, H. N., u. Streicher, J. A.: In fetal tissues. J. biol. Chem. 1948, Bd. 175, S. 95. — 13. Crumpler, H. R., Dent, C. E., u. Lindan, O.: Biochem. J. 1950, Bd. 47, S. 223. — 14. Erpf-Lefkovic, Th. A., u. Rosenbloom, J.: Biochem. Bull. Vol. 1913, Bd. II, S. 233. — 15. Falk, E.: Mschr. Gebh. 1908, Bd. 28, S. 594. — 16. Frank, R. T.: Surg., Gynec. Obstetr. 1912, Bd. XV, S. 558. — 17. Frankl, O., u. Aschner, B.: Gynäk. Rundschau 1911, Bd. V, S. 647. — 18. Fruton, J. S., u. Bergmann, M.: J. biol. Chem. 1939, Bd. 130, S. 19. — 19. Fruton, J. S.: Biol. 1941, Bd. 9, S. 211; Zit. n. Smith, E. L., in: Sumner, J. B., Myrback, K., The Enzymes. Academic Press, New York 1951. — 20. Fruton, J. S., Irving jr., G. W., u.

- Bergmann, M.: J. biol. Chem. 1941, Bd. 138, S. 249. — 21. Dies.: J. biol. Chem. 1941, Bd. 141, S. 763. — 22. Fruton, J. S.: J. biol. Chem. 1942, Bd. 146, S. 463. — 23. Fruton, J. S., Smith, V. A., und Priscoll, P. E.: J. biol. Chem. 1948, Bd. 173, S. 457. — 24. Fuhrmann, K.: Arch. Gynäk. 1959, Bd. 191, S. 661. — 25. Giroud, A., Leblond, C. P., und Giroux, M.: Compt. rend. Acad. Sci. 1934, Bd. 198, S. 850. — 26. Graefenberg, E.: Zeitschr. Gebh. 1910, Bd. 65, S. 1. — 27. Gutmann, H. R., und Fruton, J. S.: J. biol. Chem. 1948, Bd. 174, S. 851. — 28. Halban, J., u. Frankl, O.: Gynäk. Rundschau 1910, Bd. V, H. 13, S. 38. — 29. Hamilton, H. G., Higgins, R. S., Mills, R. C., u. Hellwig, F. C.: J. Obstetr. Gynec. 1950, Bd. 60, S. 251. — 30. Heinkel, K., Baumer, A., u. Henning, N.: Klin. Wschr. 1955, Bd. 33, S. 1099. — 31. Hofbauer, H.: Grundzüge einer Biologie der menschlichen Plazenta. Wien-Leipzig: Braunmüller 1905. Zit. n. Bickenbach, W. Physiologie der Plazenta. In: Seitz, L., u. Amreich, A.: Biologie und Pathologie des Weibes, Bd. VII. Urban & Schwarzenberg 1952. — 32. Holiday, E. R.: Biochem. J. 1936, Bd. 30, S. 1795. — 33. Huszák, St.: Z. physiol. Chem. 1933, Bd. 219, S. 275. — 34. Jung: 32. Tagg. Dtsch. Ges. f. Gynäkologie, 1958, im Druck. — 35. Kies, M. W., u. Schwimmer, S.: J. biol. Chem. 1942, Bd. 145, S. 685. — 36. Kogan, M.: Vracebnoe delo 1926, Bd. 9, H. 3, S. 237. Ref. Ber. Gynäk. 1926, Bd. X, S. 471. — 37. Loeb, W.: Ref. Jahresber. Gynäk. 1912, Bd. 26, S. 296. — 38. Maeda, K.: Biochem. Z. 1923, Bd. 143, S. 347. — 39. Markee, J. E.: The morphological and endocrine Basis for menstrual bleeding. In Progress in Gynecology II, Meigs and Sturgis ed. New York: Grune and Stratton 1950, S. 63. — 40. Menkin, V.: Dynamics of Inflammation. The Macmillan Company 1940. — 41. Merten, R., u. Ratzer, H.: Dtsch. Z. Verd. Stoffw.-Krkh. 1950, Bd. 10, H. 2—3, S. 87. — 42. Mischel, W.: Arch. Gynäk. 1957, Bd. 190, S. 8. — 43. Müller, E.: Der Zelltod. Hdbch. allg. Path., Bd. II/I. Heidelberg: Springer 1953, S. 613. — 44. Nakahori, K.: Jap. J. Obstetr. Gynec. 1935, Bd. 18, S. 120. — 45. Nardone, R. M.: Proc. Soc. exper. Biol. Med. 1952, Bd. 80, S. 756. — 46. Northrop, J. H., Kunitz, M., u. Herriot, R. M.: Crystalline Enzymes. Columbia University Press, New York 1948. — 47. Orringer, D., Lauber, F. U., u. Hollander, Fr.: Science (Lancaster Pa) 1950, Bd. 111, S. 88. — 48. Panlitschko, M., Kaiser, E., u. Andres, H.: Biochem. Z. 1952, Bd. 322, S. 526. — 49. Petry, G.: Fermentforsch. 1945, Bd. 17, S. 185. — 50. Ders.: Z. Gebh. 1949, Bd. 130, S. 236. — 51. Polano, O.: Z. Gebh. 1907, Bd. 59, S. 453. — 52. Potter, V. R., u. Elvehjem, C. A.: J. biol. Chem. 1936, Bd. 114, S. 495. — 53. Roche, J., u. Nataf, B.: Bull. Soc. chim. Biologique 1954, Bd. 6—7, H. 36, S. 799. — 54. Roemer: Arch. Gynäk. 1955, Bd. 186, S. 259. — 55. Schelling, H. V.: zit. in E. Weber, Grundriß der biologischen Statistik, Jena 1948, S. 157. — 56. Schmidt-Elmendorff, H. R.: Anatomie, Physiologie und Pathologie der Decidua, Eihäute usw. In: Seitz, L., u. Amreich, A.: Biologie und Pathologie des Weibes, Bd. VII, S. 239. Urban & Schwarzenberg 1952. — 57. Schroeder, R.: Arch. Gynäk. 1915, Bd. 104, S. 27. — 58. Ders.: Arch. Gynäk. 1953, Bd. 183, S. 204. — 59. Smith, E. L.: J. biol. Chem. 1948, Bd. 173, S. 553. — 60. Ders.: J. biol. Chem. 1948, Bd. 173, S. 571. — 61. Ders.: In: Sumner, J. B., u. Myrbäck, K., The Enzymes. Academic Press, New York 1951, S. 793. — 62. Stafford, D. R., McShan, W. H., u. Meyer, R. K.: Endocrinology 1947, Bd. 41, S. 45. — 63. Stark, G., u. Siebert, G.: Arch. Gynäk. 1954, Bd. 185, S. 50. — 64. Tachibana, T.: Jap. J. Obstetr. 1929, Bd. 12, S. 182 u. 200. Ref. Ber. Gynäk. 1930, Bd. 17, S. 358. — 65. Tallan, H. H., Jones, M. E., u. Fruton, J. S.: J. biol. Chem. 1952, Bd. 194, S. 793. — 66. Tietze, K.: Der weibliche Zyklus und seine Störungen. In: Seitz, L.,

u. Anreich, A., Biologie und Pathologie des Weibes, Bd. II, S. 491, Urban & Schwarzenberg 1952. — 67. Vescia, A.: Z. physiol. Chem. 1955, Bd. 299, S. 54. — 68. Vorherr, H.: Kathepsinaktivität im menschlichen Endometrium. Inaug.-Diss. Johann Gutenberg-Universität Mainz 1955. — 69. Wajzer, J. u. Zelnik, R.: Compt. rend. Acad. Sci., Paris 1951, Bd. 232, S. 1254. — 70. Wallenfels, K.: Biochem. Z. 1950, Bd. 321, S. 189. — 71. Willstätter, R. u. Bamann, E.: Z. physiol. Chem. 1928, Bd. 180, S. 127. — 72. Wiss, O.: Stoffwechsel der Eiweißstoffe und Aminosäuren, in: Flaschenträger, B. u. Lenhartz, E., Physiologische Chemie, Springer 1954, Bd. II/Ib, S. 909.

Anschr. d. Verf.: (13a) Erlangen, Universitätsstraße 21—23, Univ.-Frauenklinik

Nicht einzeln im Buchhandel käuflich

Sonderdruck aus „Zeitschrift für Geburtshilfe und Gynäkologie“

155. Band, 1. Heft, Seite 12—26. 1960

Herausgegeben von

Prof. Dr. E. Philipp in Kiel und Prof. Dr. H. Huber in Marburg/L.

Ferdinand Enke Verlag Stuttgart

Aus der Univ.-Frauenklinik Erlangen (Direktor: Prof. Dr. R. Dyr off)

Über die Wirkung der Sexualhormone auf die eiweißspaltenden Fermente der Uterusmuskulatur

Von **Karl Fuhrmann**

Mit 3 Abbildungen und 4 Tabellen

1. Einleitung

Die Proteasen sind bekanntlich Enzyme, die fähig sind, Peptidbindungen zu spalten. Entsprechend ihrer überragenden Bedeutung ist das Vorkommen im Organismus ubiquitär. Extrazellulär dienen sie zum Aufschluß der Nahrungsproteine; intrazellulär wird ihnen außer dem Abbau auch eine Funktion beim Umbau der Eiweißstoffe zugeschrieben. Nach dem Tode tritt die Wirkung der eiweißspaltenden Fermente als Autolyse in Erscheinung.

Die eiweißspaltenden Fermente wurden früher im allgemeinen in 2 Gruppen eingeteilt, in die Proteinasen und in die Peptidasen. Da sich in den letzten Jahren gezeigt hat, daß alle gut charakterisierten Proteinasen auch synthetische Peptide und ihre Derivate spalten können, unterscheidet man heute nach Bergmann (1) zwischen Endopeptidasen und zwischen den Exopeptidasen. Die Exopeptidasen wirken auf einfache Verbindungen, die eine oder mehrere freie terminale polare Gruppen besitzen wie eine α -Amino- oder α -Karboxylgruppe oder beide. Im Gegensatz dazu können Endopeptidasen Verbindungen hydrolysieren, welche keine freien terminalen Amino- oder Karboxylgruppen besitzen, oder die polare Gruppe an anderer Stelle als in α -Stellung zur Peptidbindung enthalten. Die Endopeptidasen sind fähig, auf die zentrale Peptidbindung von Eiweißen oder auf substituierte Peptide der entsprechenden Konfiguration einzuwirken. Auf das ausführliche Übersichtsreferat von Smith in Sumner Myrbäck (14), 1951, wird verwiesen.

Die vom Zyklus abhängigen Schwankungen der Exopeptidase-Aktivität im Endometrium [Führmann (5, 5a)], dessen Wachstum bekanntlich hormonal gesteuert wird, legten den Schluß nahe, daß die Sexualhormone direkt oder indirekt die Aktivität von Fermenten oder Fermentsystemen beeinflussen können. Im Tierversuch sollte geprüft werden, ob Zufuhr von Sexualhormonen in vivo zu einer Erhöhung der Exopeptidaseaktivität

führt. Da es uns nicht möglich war, Aktivitätsbestimmungen am Endometrium durchzuführen, mußten wir uns auf Untersuchungen am Uterus der kastrierten Ratte beschränken, dessen Wachstum durch Sexualhormone stimuliert wird.

2. Arbeitsmethodik und Durchführung der Versuche

2,1 Gewebezubereitung

Zu den Fermentaktivitätsbestimmungen stand uns jeweils nur eine geringe Menge Frischgewebe zur Verfügung, so daß sich eine teilweise Reinigung der Fermente, insbesondere die Herstellung von Azetontrockenpulver nicht durchführen ließ. Da außerdem hierbei unkontrollierbare Verluste der Exopeptidaseaktivität auftreten (13), mußten wir uns für unsere Vergleichsuntersuchungen auf Arbeiten mit ungereinigten Enzymlösungen beschränken. Das Gewebe wurde unmittelbar nach der Operation entnommen. Ein Teil des Gewebes diente zur histologischen Untersuchung. Ein anderer Teil des Gewebes wurde gewogen und anschließend unter Zugabe einer bestimmten Menge H_2O (1 Gew.-Teil + 9 Teile H_2O) unter Kühlung in einem Glashomogenisator (nach Potter und Elvehjem (11)) zerkleinert. Nach 3 Min. Homogenisierung (1200 U/Min.) ergab die mikroskopische Untersuchung nur noch Zelltrümmer. Das 10proz. Homogenat wurde bei 5 ° im Eisschrank bis zur Untersuchung aufbewahrt. Die Untersuchungen wurden in der Regel 6—8 Stunden nach der Materialgewinnung durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt hat, wie Enzymstabilitätsuntersuchungen ergaben, noch keine nennenswerte Fermentinaktivierung eingesetzt.

2,2 Stickstoffbestimmung

Um eine Bezugsbasis für vergleichende Untersuchungen zu haben, wurde von jedem Homogenat der Gesamtstickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt. Die ermittelten Stickstoffwerte wurden berechnet in mg Gesamtstickstoff pro ml Enzymlösung.

2,3 Bestimmung der Exopeptidaseaktivität mit der Mikrotitration nach Grassmann und Heyde (6)

Standardansatz: Das Volumen des Standardansatzes zur Bestimmung der Peptidhydrolyse betrug in der Regel 2,0 ml:

1,0 ml Enzymlösung +
1,0 ml Substratlösung.

Dazu kamen bei Aktivierungsversuchen 0,02 ml Aktivator und bei länger dauernden Versuchen 0,02 ml Toluol. Sowohl die Enzym- als auch die Sub-

stratlösung wurden mit Phosphatpuffer pH 7,2 (0,15 M) (n. Sørensen) versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Wasserbad.

Die Enzymlösungen wurden je nach der Spaltbarkeit der Substrate in einer Konzentration von 1,0 oder 0,1 % verwandt. Abweichungen von diesen Konzentrationen sind besonders angegeben. Die Fermentkonzentration entsprach einer Menge von 0,010 g oder 0,001 g Frischgewebe ml Homogenat.

Die Substratkonzentration betrug in der Regel 0,05 M im Ansatz, da diese Konzentration sich nach den Untersuchungen von Smith (13) als sehr geeignet erwiesen hat.

Bestimmung der Hydrolyse: Die Methode beruht auf der Titration der bei der Peptidhydrolyse freiwerdenden Karboxylgruppen mit $n/100$ alkoholischer Kalilauge. Durch den Alkoholzusatz wird die Mitbestimmung der Aminogruppen ausgeschaltet. Als Indikator dient eine 0,1proz. alkoholische Thymolphthaleinlösung.

Aus dem Fermentansatz wurden 0,2 ml mit 3 Tropfen alkoholischer 0,1proz. Thymolphthaleinlösung versetzt und $n/100$ alkoholischer KOH bis zur deutlichen Blaufärbung zugegeben. Nach Zugabe von 1,8 ml abs. Äthanol erfolgte die Titration mit $n/100$ alkoholischer KOH bei künstlichem Licht bis zum Endpunkt. Als Farbstandard diente eine 1/400 molare, ammoniakalische Kupferchloridlösung, der zur Trübung etwas Talkum zugesetzt wurde.

Vor Ermittlung der Fermentaktivität erfolgte die Bestimmung des Leerwertes aus dem nicht inkubierten Fermentansatz. Der Mittelwert aus 3 Bestimmungen ergab nach Abzug des Leerwertes den Wert für die Hydrolyse des Peptids.

Homogenautolyse und nicht enzymatische Substrathydrolyse: Grundsätzlich wurde vor jeder Versuchsreihe ermittelt, ob eine nicht enzymatische Hydrolyse der Substrate unter den gewählten Versuchsbedingungen stattfindet. Bei diesen Versuchen zeigte sich, daß eine solche Hydrolyse auch nach langer Inkubationszeit bei 37 °C nicht stattfindet. Ebenso ist bei 5 °C (Eisschranktemperatur) auch nach Wochen keine Aziditätszunahme zu ermitteln. Eine Autolyse des Homogenats ist bei den verwendeten Konzentrationen sehr gering, erst nach langer Inkubation machte sie sich bemerkbar. Da die Versuche im allgemeinen in kurzer Zeit durchgeführt wurden, darf die Homogenatautolyse unberücksichtigt bleiben.

Fehlerberechnung der Mikrititation nach Grassmann und Heyde: Zur Prüfung der Zuverlässigkeit der Methode zur Hydrolysebestimmung der Peptide in verschiedenen Ansätzen wurden vom gleichen Myometrium je 10 verschiedene Spaltungsansätze hergestellt

und bei 45 Minuten inkubiert. Dabei wurden folgende Werte erhalten, ausgedrückt in % Spaltung:

17, 17, 18, 15, 15, 16, 17, 16, 16, 16.

Der Mittelwert und die Streuung wurden nach folgender Formel berechnet (Koller):

$$M = \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = \frac{163}{10} = 16,3$$

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} = 0,90 \quad s = \pm 0,95$$

Der Variationskoeffizient betrug $\frac{s}{\bar{x}} = \pm 6\%$, d. h. bei dieser Mehrfachbestimmung war der Mittelwert $16,3\% \pm 0,95\%$ und die prozentuale Schwankungsbreite, auf den Mittelwert bezogen, betrug $\pm 6\%$.

2,4 Substrate

Als Substrat für unsere Untersuchungen wurden verwandt (Fa. Roche):

Glycylglycin (GG)	}	Dipeptidaseaktivität
Glycyl-l-leucin (GL)		
dl-Alanylglycin (AG)		
l-Leucylglycin (LG)		
Glycyl-l-tryptophan (GT)		
l-Leucylglycyl-glycin (LGG)	}	Tripeptidaseaktivität
Glycylglycylglycin (GGG)		

2,5 Tierversuche

Zu diesen Versuchen wurden virginelle Wistar-Ratten, die ein Gewicht von 160—180 g hatten, doppelseitig kastriert und frühestens 21 Tage, spätestens 90 Tage nach der Kastration verwandt. Da die Gewebsmenge des Uterus eines einzelnen Tieres sich für eine genaue Aktivitätsbestimmung als zu gering erwies, wurden jeweils 5 Tiere zu einer Tiergruppe zusammengenommen und die Uteri von je 5 Tieren zusammen homogenisiert. Hierdurch war es möglich, eine ausreichende Fermentmenge zu den Exopeptidasebestimmungen zu erhalten. Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet; nach Entblutung wurden die Uteri herauspräpariert und unter Zusatz von H₂O in einem Gewichtsverhältnis von 1:10, wie angegeben, homogenisiert. Ein Teil der Uteri wurde zur histologischen Untersuchung entnommen. Außerdem erfolgte am Tage der Tötung zur Kontrolle der Hormonwirkung die Abnahme eines Scheidenabstriches. Die Fermentaktivitätsbestimmungen wurden nach Grassmann und Heyde (6) (s. S. 13) unter Standardbedingungen durchgeführt. Parallel zu jeder Versuchsgruppe lief eine Kontrollgruppe von Tieren unter gleichen Versuchsbedingungen.

2,51 Bestimmung der Exopeptidaseaktivität im Uterus nach Zufuhr von Follikelhormon (Östradiolbenzol in Sesamöl, Fa. Schering)

Gruppe I: 40 Tage nach der Kastration erfolgte Injektion von 0,350 mg Östradiolbenzoat (s.c.) und nach 24, 48, 72, 96 und 144 Stunden die Bestimmung der Fermentaktivität.

Gruppe II: Versuchsanordnung wie in Gruppe I. An Stelle von 0,350 mg wurde 1,0 mg Östradiolbenzoat (s.c.) gespritzt.

Gruppe III: 21 Tage nach der Kastration wurden täglich 0,005 mg Östradiolbenzoat (s.c.) 15 Tage lang injiziert. In Abständen von 2 Tagen wurde am 1., 3., 5., 7., 9., 11., 13. und 15. Tag nach Versuchsbeginn die Fermentaktivität bestimmt.

Gruppe IV: 90 Tage nach Kastration erfolgte Injektion von je 0,010 mg Östradiolbenzoat Tag (s.c.) über eine Zeitspanne von 3 Tagen. Am 4. Tag nach Versuchsbeginn wurde die Fermentaktivität bestimmt.

Gruppe V: Versuchsanordnung wie bei Gruppe IV. an Stelle von 0,010 mg wurde jedoch 0,050 mg Östradiolbenzoat gespritzt.

Gruppe VI: Versuchsanordnung wie bei Gruppe IV und V. An Stelle von den angegebenen Dosen wurden 0,500 mg Östradiolbenzoat injiziert.

2,52 Bestimmung der Exopeptidaseaktivität nach Zufuhr von Gelbkörperhormon (Progesteron in Sesamöl, Fa. Schering)

Gruppe I: 40 Tage nach der Kastration erfolgte Injektion von 5 mg Progesteron (s.c.) täglich über einen Zeitraum von 6 Tagen. Die Tiere wurden am 9. Tag nach Versuchsbeginn getötet und die Fermentaktivität bestimmt.

Gruppe II: 90 Tage nach der Kastration wurde je 0,010 mg Östradiolbenzoat und je 2,5 mg Progesteron (s.c.) pro Tag über eine Zeitspanne von 3 Tagen injiziert. Am 4. Tag nach Versuchsbeginn wurde die Fermentaktivität bestimmt.

Gruppe III: 90 Tage nach der Kastration erfolgte 2 Tage lang die Injektion von je 0,500 mg Östradiolbenzoat/Tag und daran anschließend 9 Tage die Injektion von je 2,5 mg Progesteron/Tag. Am 11. Tag nach Versuchsbeginn wurde die Fermentaktivität bestimmt.

2,6 Zur Darstellung der Versuchsergebnisse

Bei der Darstellung der Versuchsergebnisse werden folgende Abkürzungen benutzt und Rechnungen vorgenommen:

Vers.-Nr.	Nummer des Versuches.
Ges.N.	Gesamtstickstoffgehalt in mg N/ml Enzymlösung; 1% Homogenat
J.-Zeit	Inkubationszeit oder Spaltungszeit in Minuten oder bei längerer Inkubationszeit in Stunden bei 37°.
Hy-%	Substrathydrolyse im Prozentsatz der erhaltenen Spaltung, wobei Ausgangsmenge = 100% gesetzt ist. Bei der Mikrotitration nach Grassmann und Heyde wird er berechnet aus der verbrauchten Menge an n/100 alkohol. KOH, wobei 100% die vollständige Lösung der Peptidbindung bedeuten.
C ₀	Proteolytischer Koeffizient C ₀ Dieser Koeffizient gibt die Aktivität einer Enzymlösung an, wenn die Enzymreaktion linear verläuft. Es wird aus K ₀ nach der Formel $C_0 = \frac{K_0}{N}$ gerechnet, wobei N der Gesamtstickstoffgehalt in mg pro ml Enzymlösung ist.
K ₀	Reaktionskonstante K ₀ Bei linearem Spaltungsverlauf wurde sie berechnet nach der Formel $K_0 = \frac{1}{t} \cdot \frac{a}{a_0}$ t = Zeit a ₀ = Ausgangsmenge = 100% a = gespaltene Menge in % bedeuten.
C ₁	Proteolytischer Koeffizient C ₁ Dieser Koeffizient gibt die Aktivität einer Enzymlösung an, wenn die Fermentreaktion annähernd wie eine 1. Ordnungsreaktion verläuft. Es wird berechnet aus K ₁ nach der Formel $C_1 = \frac{K_1}{N}$ wobei N der Gesamtstickstoffgehalt in mg pro ml Enzymlösung ist.
K ₁	Reaktionskonstante K ₁ Bei nicht linearem Spaltungsverlauf, d. h. wenn die Fermentreaktion annähernd wie eine Reaktion 1. Ordnung verlief, wurde die Reaktionskonstante nach folgender Formel in dekad. Logarithmen berechnet $K_1 = \frac{1}{t} \log \left(\frac{a_0}{a_0 - a} \right)$ wobei t = Zeit a ₀ = Ausgangsmenge = 100% a = gespaltene Menge in % bedeuten.

3. Versuchsergebnisse

3,1 Exopeptidaseaktivität im Rattenuterus nach Kastration bei Zufuhr von Follikelhormon

Gruppe I: Durch Injektion einer Imaligen Dosis von 0,350 mg Östradiolbenzoat wird bei der Ratte ein Östrus erzeugt. 48 Stunden nach der Injektion sind die Uteri vergrößert, gerötet und mit klarer Flüssigkeit gefüllt. Im Abstrich sind kernlose Schollen nachzuweisen. Der Anstieg des mittleren Uterusgewichtes (mg/100 g Ratte) im zeitlichen Verlauf nach einer Injektion von 0,350 mg ist in Abb. 1 dargestellt.

Die Ergebnisse der Exopeptidaseaktivitätsbestimmungen (24, 48, 72, 96 Std. nach Injektion) sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Da nur eine Kontrollgruppe zur Verfügung stand, wurde zur statistischen Berechnung aus den prozentualen Abweichungen der C_1 - bzw. C_0 -Werte vom C_1 - bzw. C -Mittelwert die mittlere prozentuale Schwankung der Einzelbestimmung ermittelt. Diese beträgt $\pm 13,3\%$. In Abb. 2 ist zum Vergleich des zeit-

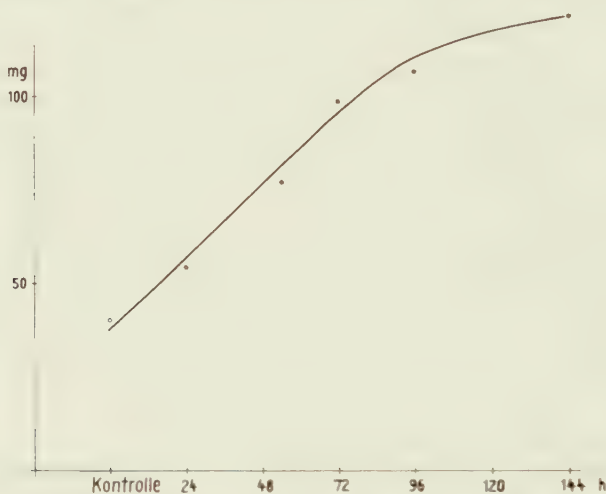


Abb. 1. Zunahme des Uterusgewichtes in mg/100 g Ratte, Gruppe I: nach Injektion von 0,350 mg Ostradiolbenzoat. Ordinate: Uterusgewicht in mg/100 g Ratte. Abszisse: Stunden nach der Follikelhormoninjektion.

lichen Verlaufes der Dipeptidaseaktivität nach der Follikelhormoninjektion der prozentuale Anstieg der Fermentaktivität aufgezeichnet, wobei die Aktivität in der Kontrollgruppe 100% gesetzt wurde. Aus dieser Darstellung geht hervor, daß die Exopeptidaseaktivität im Rattenuterus nach einer einmaligen Hormoninjektion ansteigt, ein Maximum erreicht und dann langsam wieder abfällt. Die höchste Aktivität der GG-Dipeptidase (ohne und mit C_0H -Zugabe), der GL- und AG-Dipeptidase tritt 48 Std. nach der Injektion auf (Abb. 2, Kurve 1, 2, 3, 4). Dieser Anstieg von 24 auf 48 Std. ist selbst bei der AG-Dipeptidase (Kurve 4) statistisch gesichert. Dagegen läßt sich über den Verlauf ab 72 Std. bei der GG- und AG-Dipeptidaseaktivität nichts Endgültiges aussagen (Kurve 1 und 4). Da die Aktivität der GG-, GL- und AG-Dipeptidase einen gleichen zeitlichen Verlauf zeigte, wurde eine Mittelwertskurve eingezeichnet. Die mittlere Schwankungsbreite der Mittelwerte beträgt nur $\pm 6,7\%$, d. h. der Verlauf dieser Mittelwertskurve ist statistisch gesichert. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen steht die LG-Dipeptidase (Kurve 5), bei der das Maximum der Fermentaktivität erst 96 Std. nach der Injektion erreicht wird. Die Werte liegen so, daß die Verschiebung des Maximums als echt erscheint.

Tab. I. Dipeptidaseaktivität im Rattenuterus nach Kastration.
Injektion von 0,350 mg Östradiolbenzoat (etwa 90 Tage nach Kastration)

A Vers. Nr.	B Tierzahl	C Std. nach Inj.	D gUt.-Gew./100 g Ratte	E Ges. N 1 % Homogenat	F GG $C_1 \cdot 10^2$	G GG + Co (0,001 M) $C_1 \cdot 10^2$	H GL $C_1 \cdot 10^2$	I AG $C_1 \cdot 10^2$	J LG $C_1 \cdot 10^2$
1	5	0 Kontr.	0,040	0,185	0,140	0,153	1,16	1,07	0,265
2	5	24	0,054	0,204	0,137	0,185	1,27	1,10	0,275
3	5	48	0,077	0,185	0,301	0,730	3,12	1,99	0,600
4	10	72	0,098	0,258	0,163	0,620	2,5	1,46	0,839
5	5	96	0,106	0,140	0,152	0,401	2,41	1,59	1,424
6	5	144	0,121	0,306	0,151	0,271	1,93	1,98	0,797
Injektion von 1,0 mg Östradiolbenzoat									
7	5	144	0,120	0,218	0,231		3,19	0,99	0,942

I = l-Leucylglycin-Dipeptidase
 C_1 bzw. C_0 = proteolytischer Koeffizient
 (s. S. 17). Mittelwert aus 2 Bestimmungen
 bei 45 und 90 Minuten

F = Glycylglycin-Dipeptidase
 G = Glycylglycin-Dipeptidase
 + Co 0,001 M
 H = Glycin-l-leucin-Dipeptidase
 I = dl-Alanylglycin-Dipeptidase

Uterusinhalt
GL-Hydrolyse

A Lfd. Nr.	B Anzahl der Tiere	C J.-Zeit Std.	D gUt. Gew./100 g Tier	E Konzentration	F Zeit Std.	G H_2 %
1	5	72	0,098	50 %	24	0,0
2	5	144	0,120	100 %	27	78,2
LG-Hydrolyse						
3	5	48	0,077	50 %	24	0,0
4	5	144	0,121	50 %	23	29,0
5	5	144	0,120	100 %	24	76,0

Im Uterusinhalt läßt sich erst 144 Std. nach Injektion eine Peptidase-aktivität feststellen (s. Tab. 1 unten).

Gruppe II: Die Exopeptidaseaktivität ist 144 Std. nach einer 1maligen Follikelhormondosis von 1,0 mg Östradiolbenzoat nicht wesentlich höher als nach 0,350 mg Östradiolbenzoat (Gruppe I) (Tab. 1).

Gruppe III: Hier wurde die Fermentaktivität über 15 Tage bei

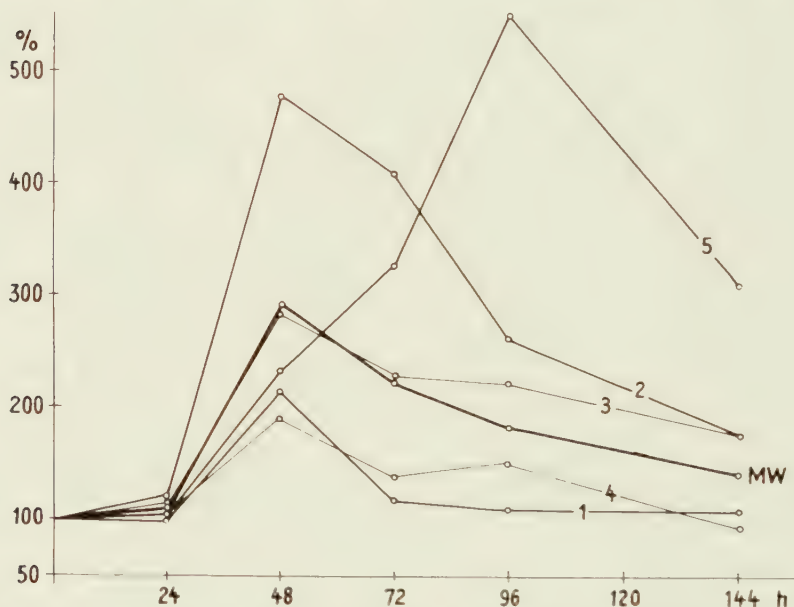


Abb. 2. Prozentualer Anstieg der Dipeptidase-Aktivität im Rattenuterus nach Injektion von 0,350 mg Östradiolbenzoat s.c. s. Text.

Ordinate: Prozentualer Anstieg der Fermentaktivität gegenüber der Kontrollgruppe = 100% gesetzt. Abszisse: Stunden nach der Follikelhormoninjektion. 1. Glycylglycine-Hydrolyse; 2. Glycylglycine-Hydrolyse + Co II (0,001 M); 3. Glycyl-Leucine-Hydrolyse; 4. dl-Alaninylglycine-Hydrolyse; 5. l-Leucin-Glycine-Hydrolyse

gleichbleibender täglicher Follikelhormoninjektion von 0,005 mg täglich bestimmt. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Außer der GG-, GL-, AG- und LG-Hydrolyse wurde die Spaltung von Glycyl-L-Tryptophan bestimmt. Bei diesem Substrat wurde auf Grund der erhaltenen Spaltungswerte zum Vergleich C_1 zugrunde gelegt. Die prozentuale Abweichung der Aktivität von der Kontrollgruppe (C_0 bzw. $C_1 = 100\%$) in Abhängigkeit von der Zeit ist in Abb. 3 dargestellt. Aus der Abbildung geht hervor, daß bei gleichbleibender Injektion von Follikelhormon innerhalb von 3–5 Tagen bei allen Peptidasen ein Aktivitätsmaximum erreicht wird. Danach fällt die Aktivität zunächst ab; nach dem 7. bis 9. Tag scheint sie dann erneut anzusteigen. Der zweigipfelige Kurvenverlauf läßt sich bei 2 Fermenten (1 und 5) statistisch sichern.

Tab. 2. Dipeptidaseaktivität im Rattenuterus nach Kastration.
Tägliche Injektion von
0,005 mg Östradiolbenzoat über 15 Tage (etwa 14 Tage nach Kastration)

A Vers. Nr.	B Anzahl der Tiere	C Tg. nach Injektion	D gUt.-Gew./100 g Ratte	E Ges. N 1 % Homo- genat	F GG $C_1 \cdot 10^2$	G GL $C_1 \cdot 10^2$	H AG $C_1 \cdot 10^2$	I LG $C_0 \cdot 10^2$	K GT $C_1 \cdot 10^2$
1	5	0 Kontr.	0,049	0,210	0,89	2,41	1,34	0,619	2,601
2	5	1	0,088	0,192	1,00	2,88	1,49	0,679	2,62
3	5	3	0,138	0,183	2,43	3,03	1,72	0,732	5,59
4	5	5	0,122	0,155	1,88	3,49	1,51	1,023	4,22
5	5	7	0,179	0,232	0,92	2,34	0,94	0,780	2,54
6	5	9	0,136	0,251	0,92	2,69	1,07	0,657	2,23
7	5	11	0,146	0,206	1,90	3,16	1,69	0,586	4,07
8	5	13	0,177	0,220	2,02	2,72	1,40	0,867	5,36
9	5	15	0,175	0,224	1,99	2,43	1,19	0,780	2,79

C_1 bzw. C_0 = proteolytischer Koeffizient (s. S. 17).
Mittelwert aus 2 Bestimmungen bei
45 und 90 Minuten

F = Glycylglycin-Dipeptidase
G = Glycyl-L-Leucine-Dipeptidase
H = dl-Alanylglycin-Dipeptidase
I = L-Leucylglycin-Dipeptidase
K = Glycyl-L-Tryptophan-Hydrolyse

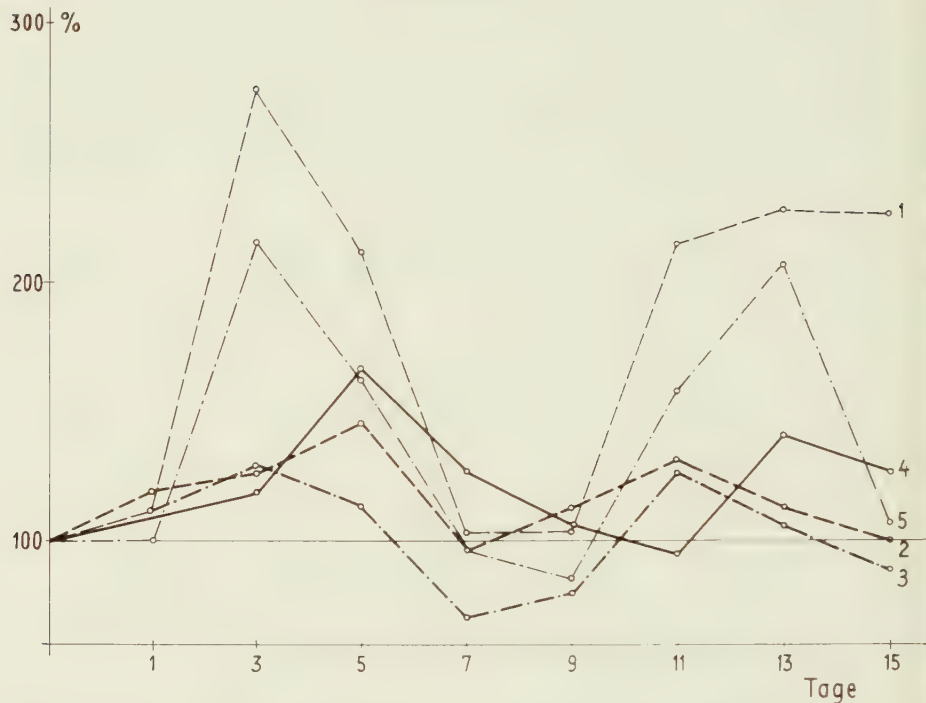


Abb. 3. Prozentualer Anstieg der Dipeptidase-Aktivität im Rattenuterus bei täglicher Injektion von 0,005 mg Östradiolbenzoat täglich über 15 Tage.
 Ordinate: Prozentualer Anstieg der Fermentaktivität gegenüber der Kontrollgruppe = 100% gesetzt.
 1. Glycylglycine-Dipeptidase; 2. Glycyl-L-Leucine-Dipeptidase; 3. dl-Alanylglycine-Dipeptidase;
 4. L-Leucylglycine-Dipeptidase; 5. Glycyl-L-Tryptophan-Hydrolyse.
 Abszisse: Tage des Versuchs

Gruppe IV, V, VI: Die Injektion von 0,010, 0,050 und 0,500 mg Östradiolbenzoat führte bei allen Peptidasen zu einem Aktivitätsanstieg, der sich gegenüber der Kontrollgruppe statistisch sichern läßt. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

3.2 Exopeptidaseaktivität im Rattenuterus nach Kastration bei Zufuhr von Progesteron

Bei diesen orientierenden Versuchen wurde in der auf S. 16 angegebenen Versuchsanordnung die GG-, GL-, AG- und LG-Dipeptidaseaktivität und die Tripeptidaseaktivität mit LGG und GGG bestimmt. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Es wurden zum Vergleich die proteolytischen Koeffizienten C_1 bzw. C_2 zugrunde gelegt.

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß in Gruppe I die GG-, GL- und LG-Dipeptidaseaktivität im Rattenuterus auch durch alleinige Progesteroninjektion (Gruppe I), 5 mg über 6 Tage ansteigt. Der Anstieg entspricht teilweise etwa der Höhe des Aktivitätsanstieges nach Östrogenzufuhr.

Tab. 3. Dipeptidaseaktivität im Rattenuterus nach Kastration.
Injektion von 0,010, 0,050, 0,500 mg Östradiolbenzoat. (Etwa 50 Tage nach Kastration)

A Vers. Nr.	B Anzahl der Tiere	C Tg. Vers.	D Dosis in mg Östradiol- benzoat	E gUt.-Gew./100 g Ratte	F Ges. N	G GG $C_1 \cdot 10^2$	H GL $C_1 \cdot 10^2$	I AG $C_1 \cdot 10^2$	K LG $C_0 \cdot 10^2$	L GT $C_1 \cdot 10^2$	M GGG $C_0 \cdot 10^2$	N LGG $C_0 \cdot 10^2$
1	5	0	0,0 Kontr.	0,030	0,263	0,31	1,34	1,60	0,417	0,336	0,46	0,54
2	5	3	$3 \times 0,010 \text{ Ö.}$	0,085	0,220	1,48	2,83	5,45	0,633	0,814	0,75	0,81
3	5	3	$3 \cdot 0,050 \text{ Ö.}$	0,087	0,173	1,51	6,93	8,32	0,734	1,280	0,87	1,14
4	5	3	$3 \cdot 0,500 \text{ Ö.}$	0,099	0,146	1,27	8,63	11,0	1,043	1,880	0,96	1,18

C_1 bzw. C_0 proteolytischer Koeffizient
Mittelwert aus 2 Bestimmungen bei 45 und 90 Minuten
M : Glycylglycylglycin-Tripeptidase
N : L-Leucylglycylglycin-Tripeptidase

Bei den Tieren, denen gleichzeitig Östradiolbenzoat und Progesteron verabfolgt wurde (Gruppe II), war die GL-Dipeptidaseaktivität gegenüber der Gruppe, die nur Östradiolbenzoat erhalten hatte, erhöht. In der Versuchsgruppe III war die GG-, GL-, AG-Aktivität deutlich gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.

Der Einfluß des Gelbkörperhormons auf die Dipeptidaseaktivität mußte auf breiterer Basis weiterstudiert werden.

4. Diskussion

Am Uterus der kastrierten Ratte wurde sowohl die Fermentaktivität des Endometriums als auch die Aktivität des Myometriums bestimmt. Es konnte nachgewiesen werden, daß unter Östrogen- und Progesteroneinfluß im Uterus bei kastrierten Tieren eine Aktivitätssteigerung der Exopeptidasen erfolgt. Das steht in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen über den Einfluß von Steroidhormonen auf Fermentsysteme und Stoffwechselvorgänge im Uterus der kastrierten Ratte [Telfer (15), Longwell und Reif (9): Succinoxidase, Zytochromoxydase; Lucas u. Mitarb. (10): Peroxydase; Bever, Velardo und Hisaw (2): Milchsäurehydrogenase-DPNH-Oxydase; Eschbach und Naegelein (4): Atmung und Glykolyse wie auch früher schon Khayyal und Scott (8), Keryly (7) u. a.; Übersicht s. bei Dirschel (3)]. Es wurde bisher nur

Tab. 4. Dipeptidaseaktivität im Rattenuterus nach Kastration.
Injektion von Progesteron, Progesteron + Östradiolbenzoat

A Vers. Nr.	B Anzahl der Tiere	C Tg. Vers.	D Dosis	E gUt.-Gew. 100 g Ratte	F Ges. N	G GG $C_1 \cdot 10^2$	H GL $C_1 \cdot 10^2$	I AG $C_1 \cdot 10^2$	K LG $C_0 \cdot 10^2$
1	5	0	0,0 Kontr.	0,040	0,185	0,140	1,11	1,07	0,26
2	5	9	6 $\times$ 5 mg Progest.	0,062	0,255	0,252	2,11	1,06	0,62

Progesteron + Östradiolbenzoat

A Vers. Nr.	B Anzahl der Tiere	C Tg. Vers.	D Dosis mg	E gUt.-Gew. 100 g Ratte	F Ges. N	G GG $C_1 \cdot 10^2$	H GL $C_1 \cdot 10^2$	I AG $C_1 \cdot 10^2$	K LG $C_0 \cdot 10^2$	L LG $C_0 \cdot 10^2$	M GGG $C_0 \cdot 10^2$
1	5	0	0,0	0,030	0,263	0,31	1,34	1,60	0,42	0,54	0,46
2	5	3	3 $\times$ 0,010	0,085	0,220	1,48	2,83	5,45	0,63	0,81	0,75
3	5	3	3 $\times$ 0,010 Ö. 3 $\times$ 2,5 Pro.	0,071	0,198	1,94	5,17	5,23	0,84	0,84	0,57
4	5	11	2 $\times$ 0,50 e. 9 $\times$ 2,5 Pro.	0,105	0,147	5,05	9,80	10,6	0,45	0,68	0,25

Legende entsprechend der Tab. 1 bis 3

von Roche und Nataf (12) das Verhalten der Leucinaminopeptidase (Substrat Leucylglycin) im Meerschweinchenuterus nach Östrogen- und Progesterongaben untersucht.

Parallel mit den makroskopisch und mikroskopisch am Uterus der kastrierten Ratte auftretenden Veränderungen ist nach einer einmaligen Injektion von Follikelhormon ein Anstieg der Exopeptidaseaktivität mit einem deutlichen Maximum zu beobachten, dem wieder ein Abfall der Aktivität folgt. Das Maximum der GG-Dipeptidaseaktivität (mit und ohne Kobaltaktivierung) und der GL- und AG-Dipeptidase tritt bereits 48 Std. nach der Injektion auf, während die Leucinaminopeptidaseaktivität langsamer ansteigt. Es ist bemerkenswert, daß die Exopeptidaseaktivität nur mit dem Anstieg des Uterusgewichtes parallel zu gehen scheint und schon wieder abfällt, wenn das Maximum des Uterusgewichtes gerade erst erreicht ist. Das spricht für die Bedeutung der eiweißspaltenden Fermente beim Zellwachstum, wo zweifellos ein gesteigerter Eiweißstoffwechsel besteht. Es läßt sich nicht entscheiden, ob das Östrogen direkt die Peptidaseaktivität beeinflußt.

Bei täglichen Injektionen von kleinen Follikelhormondosen scheint sich ein 2gipfelter Kurvenverlauf auszubilden, wobei um den 7. und 9. Tag die Aktivität wieder auf den Nullwert absinkt. Bever, Velardo und Hisaw (2) konnten bei der uterinen Dehydrogenase-DPNH-Oxydase-Aktivität einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf beobachten. Die erste Gipfelbildung der Exopeptidaseaktivität erfolgte bei täglicher kleiner Hormongabe etwas später als bei der anderen Tiergruppe, die nur eine 1malige, allerdings höhere FH-Injektion erhalten hatte. Die wahrscheinlichste Erklärung für den 2gipfeligen Verlauf der Exopeptidaseaktivität ist die, daß bei gleichbleibender Follikelhormonzufuhr an der kastrierten Ratte der Brunstzyklus nachgeahmt wird. Der Östrus der Ratte kann in Abständen von etwa 4—8 Tagen auftreten. Die beobachteten Gipfel der Peptidaseaktivität stimmen annähernd mit diesen Zeiten überein. Man kann für die Bremsung der Aktivität zwischen den beiden Gipfeln einen gegenregulatorischen Effekt vermuten.

Die durchgeführten Aktivitätsbestimmungen 3 Tage nach einer verschiedenen hohen FH-Dosis ließen nur bei 2 Dipeptidasen eine Dosisabhängigkeit erkennen. Auf die nur zur Orientierung durchgeführten Versuche mit Progesteron soll nicht näher eingegangen werden, da dabei sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden. Derartige Untersuchungen sind dadurch erschwert, daß die Progesteronwirkung immer im Zusammenhang mit der Östrogenwirkung gesehen werden muß.

Zusammenfassung

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen nach 1maliger Östrogengabe die Dipeptidaseaktivität im Uterus ansteigt, um dann innerhalb von 6 Tagen wieder auf den Ausgangswert abzufallen. Das Aktivitätsmaximum liegt bei 48 bzw. 96 Stunden nach der Hormoninjektion.

Bei gleichbleibender täglicher Injektion kleiner Östrogendosen über 15 Tage scheinen sich 2 Gipfel der Dipeptidaseaktivität auszubilden, die etwa dem Brunstzyklus der Ratte entsprechen. Eine Abhängigkeit der Di- und Tripeptidaseaktivität von der Östrogendosis konnte nur bei 2 Dipeptidasen nachgewiesen werden. Auch Zufuhr von Progesteron kann unter den gewählten Versuchsbedingungen zu einer Aktivitätssteigerung einiger Dipeptidasen führen.

Schrifttum

1. Bergmann, M.: Adv. Enzymologie 1942, Bd. 2, S. 49. — 2. Bever, A. T., Velardo, J. T., und Hisaw, F. L.: Endocrinology 1956, Bd. 58, S. 512. — 3. Dirscherl, W.: Erg. Physiol. 1955, Springer 1955, S. 112. — 4. Eschbach, W., und Negelein, E.: Arch. Gynäk. 1956, Bd. 188, S. 84. — 5. Fuhrmann, K.: Über die eiweißspaltenden Fermente der weiblichen Genitalorgane unter besonderer Berücksichtigung des Endometriums. Habilitationsschrift, Erlangen 1958. — 5a. Fuhrmann, K.: Arch. Gynäk. 1959, Bd. 191, S. 661. — 6. Grassmann, W., und Heyde, W.: Z. physiol. Chem. 1929, Bd. 183, S. 32. — 7. Kerly, M.: Biochem. J. 1940, Bd. 34, S. 814. — 8. Khayyal, M. A., und Scott, C. M.: Quart. J. exper. Physiol. 1934, Bd. 24, S. 249. — Ders.: J. exper. Physiol. 1935, Bd. 25, S. 77. — 9. Longwell, B. B., und Reif, A. E.: Fed. Proc. 1954, Bd. 13, S. 255. Zit. n. Bever, A. T., Velardo, J. T., und Hisaw, F. L.: Endocrinology 1956, Bd. 58, S. 512. — 10. Lucas, F. V., Newfeld, H. A., Utterback, J. G., Martin, A. P., und Stotz, E.: J. biol. Chem. 1955, Bd. 214, S. 775. — 11. Potter, V. R., und Elvehjem, C. A.: J. biol. Chem. 1936, Bd. 114, S. 495. — 12. Roche, J., und Nataf, B.: Bull. Soc. chim. Biologique 1954, Bd. 6—7, H. 36, S. 799. — 13. Smith, E. L.: J. biol. Chem. 1948, Bd. 173, S. 553. — 14. Ders.: In: Summer, J. B., u. Myrback, K.: The Enzymes. Academic Press. New York 1951, S. 792. — 15. Telfer, M. A.: Arch. Biochem. Biophys. 1953, Bd. 44, S. 111.

Anschr. d. Verf.: (13 a) Erlangen, Universitätsstr. 21—23, Univ.-Frauenklinik

Aus der Universitäts-Frauenklinik Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. R. D y r o f f)

Kolorimetrische Bestimmung und histochemischer Nachweis der Aminopeptidase an Geweben weiblicher Genitalorgane

Von **K. Fuhrmann**

Mit 13 Abbildungen

1. Einleitung

Schon sehr früh wurde nach Wegen gesucht, eiweißspaltende Fermente histochemisch im Gewebe darzustellen. Neubauer und Fischer [19] empfahlen 1909 als grob orientierende Methode zum Nachweis von Peptidasen im Gewebe die Substrate Glycyl-l-Tryptophan und Chloracethyl-l-Tryptophan, da nur das hydrolytisch abgespaltene Tryptophan, nicht aber das peptisch gebundene eine Rosarot-Färbung mit Bromwasser gibt [1]. Abderhalden [2] konnte 1910 in Geweben, die in Seidenpeptonlösung inkubiert worden waren, Tyrosinkristalle nachweisen. Die ersten Aussagen über die Verteilung der Peptidaseaktivität im Gewebe wurden durch die von Linderstrøm-Lang [13] entwickelten mikrochemischen Titrationsmethoden ermöglicht. Peptidasen in Einzelzellen oder kleineren Gewebsverbänden lassen sich aber mit diesem Verfahren nur unter schwierigen Versuchsbedingungen nachweisen. Einen eindeutigen Fortschritt bezüglich der genauen Lokalisation von eiweißspaltenden Fermenten im Gewebe brachte die von Marshall [14] (1954) angegebene Nachweismethode für Chymotrypsin und Procaryboxypeptidase mittels fluoreszinmarkierter Antikörper. Durch die in letz-

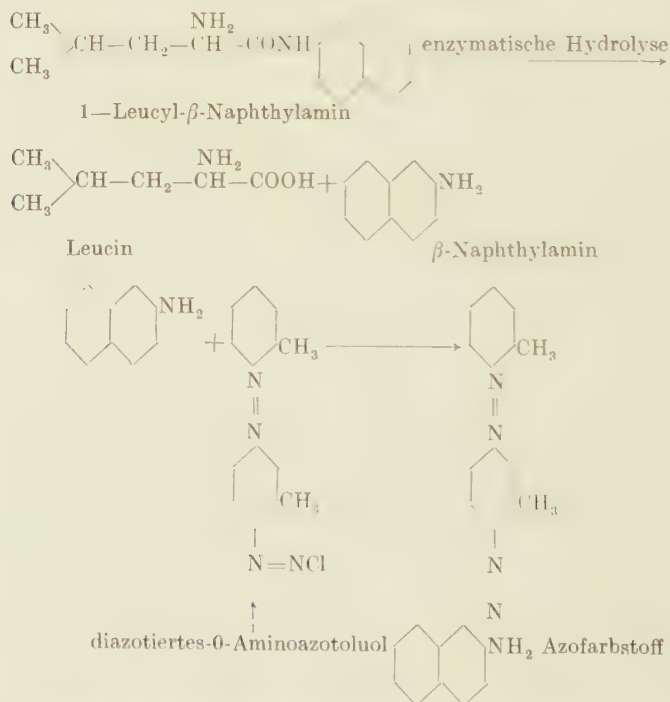
ter Zeit entwickelten synthetischen chromogenen Substrate ist es möglich geworden, Peptidasen im Gewebe darzustellen. Bei diesen chromogenen synthetischen Substraten handelt es sich um Substanzen, die unter anderem Phenol, α -Naphthol oder β -naphthylamin enthalten. Nach fermentativer Abspaltung können diese mit Diazoniumsalzen gekoppelt werden, wobei eine intensive Farbentwicklung entsteht [8, 10, 23, 24, 27, 12]. Es wurden Substrate für die Bestimmung des Chymotrypsin (Ravin u. a. [24] (1954), der Carboxypeptidase (Ravin u. a. [23] (1951) eingeführt.

Zur Bestimmung der Amino-peptidaseaktivität wurden

Glycyl- β -Naphthylamin (GN),
dl-Alanyl- β -naphthylamin (AN) und
l-Leucyl- β -naphthylamin (LN)

1954 von Gomori [10 und 11], Folk u. a. [8], Green und Mitarbeitern, 1955 [12], empfohlen, da die abgespaltene β -Naphthylamingruppe mit Diazoniumsalzen eine Farbreaktion ergibt. Dadurch wird eine kolorimetrische Bestimmung der enzymatischen Hydrolyse der Substrate möglich.

Die Reaktion verläuft nach folgender Formel:



Das Substrat l-Leucyl- β -naphthylamin nimmt insofern eine Sonderstellung ein, als es die Spezifitätserfordernisse einer Leucinaminpeptidase zu erfüllen scheint [12]. Es besteht strenge optische Spezifität, da nur l-Leucyl- β -naphthylamin hydrolysiert wird [12]. Alle diese chromo-

somen Substrate werden durch menschliche und tierische Gewebe, Serum und Urin hydrolysiert [8, 10, 12]. Die stärkste Aktivität konnte an der Niere festgestellt werden. Das pH -Optimum lag bei AN zwischen 6,6 bis 7,0 [10], bei LN zwischen 7,0 und 7,4. Durch Carboxypeptidase werden AN und LN und durch Endopeptidasen wie Trypsin, Pepsin und Chymotrypsin werden GN, AN und LN nicht gespalten. GN wird durch Papain nicht hydrolysiert. Bei GN konnte G o m o r i [10] eine Aktivierung durch Coll beobachten, während die Hydrolyse von AN und LN durch Nierenhomogenat in Anwesenheit von Coll gehemmt wurde [8, 12].

Untersuchungen an Genitalorganen mit diesen Substraten lagen bisher noch nicht vor. In der folgenden Arbeit wurden die synthetisch hergestellten Substrate Glycyl- β -naphthylamin, dl-Alanyl- β -naphthylamin und l-Leucyl- β -naphthylamin-hydrochlorid verwendet. Es wurde zunächst die Spaltung derartiger synthetischer Substrate durch Endometriumhomogenat überprüft. Im 2. Teil der Arbeit wurde erstmals versucht, den histochemischen Nachweis der Amino-peptidase an Geweben weiblicher Genitalorgane zu führen.

2. Arbeitsmethodik

a) Von den verwendeten Substraten wurden Glycyl- β -naphthylamin und dl-Alanyl- β -naphthylamin synthetisch hergestellt. l-Leucyl- β -naphthylamin wurde als salzsaures Salz von Dajak-Laboratories (USA) bezogen.

Substratsynthese: (Die Synthese wurde unter Mitarbeit von Dr. D i t t m e y e r durchgeführt.)

Glycyl- β -naphthylamin (G o m o r i 1954 [10]):

Zunächst wurde Chloracetyl- β -naphthylamin (G o m o r i 1954) durch Azetylierung von β -Naphthylamin mit Chlorazethylchlorid im Azeton-Pyridin-Gemisch dargestellt und zweimal aus 60%igem wäßrigem Methanol umkristallisiert. Fp 113° C.

3 g der erhaltenen Substanz wurden dann in 100 ml Methanol gelöst, mit 100 ml NH_3 (25%) versetzt und 24 Stunden im Bombenrohr auf 37 bis 40° erhitzt. Nach dieser Zeit wurde die Lösung filtriert, im Vakuum bei Zimmertemperatur auf 50 ml eingedampft und mit 30 ml Äthanol sowie 20 ml H_2O versetzt. Dann wurde mit verdünnter Essigsäure angesäuert und mit 1 g Aktivkohle zum Sieden erhitzt. Nach Alkalisierung des Filtrates mit NaOH (gegen Phenolphthalein) fiel beim Abkühlen das Glycyl- β -naphthylamin aus, das nach dem Abfiltrieren mit 30%igem Methanol mehrmals bei 0° gewaschen und dann bei 30° C im Vakuum getrocknet wurde. Ausbeute: 25%. Fp 114 bis 115° C.

dl-Alanyl- β -naphthylamin (Folk und Burstone 1956 [8]).

5 g β -Naphthylamin wurden in 150 ml Azeton aufgelöst und 15 ml α -Bromopropionylbromid hinzugefügt. Die Lösung wurde unter Kühlung mit 25 ml Pyridin langsam versetzt und nach Beendigung der Reaktion in kaltes Wasser geschüttet. Die Umkristallisation des ausgefallenen Niederschlags erfolgte aus Methanol-Wasser. Das erhaltene α -Bromopropionyl- β -naphthylamin wurde in Methanol gelöst, ein gleiches Volumen von konzentrierter NH_4OH (25%) hinzugefügt und die Mischung in einem Druckgefäß für 8 Tage auf 60° erwärmt. Die Lösung wurde auf 50 ml im Vakuum bei 30° eingedampft und 100 ml Äthanol und 1 ml 1 N Essigsäure zugegeben. Nach kurzem Kochen mit 2 g Aktivkohle wurde

filtriert, mit NaOH gegen Phenolphthalein leicht alkalisch gemacht, die Lösung gekühlt und die weißen Kristalle der Alanylverbindung aus 50% Methanol abgetrennt. Fp 99 bis 100° C.

b) Die Kupplungsreaktion mit Diazoniumsalzen:
Aus folgenden Diazoniumsalzen:

Diazotiertes o-Aminoazotoluol (I)

Tetrazotiertes Di-o-Anisidin (II)

Diazotiertes 4-Amino-3,6-dimethoxy-4-nitro-azobenzol (III)

Diazotiertes 1-Amido-4-benzoyl-amido-2,5-dimethoxy-benzol (IV)

Diazotiertes 5-Nitro-2-aminoanisol (V)

wurde in einer Reihe von Vorversuchen das diazotierte o-Aminoazotoluol (I) neben dem tetrazotierten Di-o-anisidin (II) als am geeignetsten befunden.

Standardansatz, Aktivitätsbestimmung: Die Gewebszubereitung erfolgte wie früher angegeben. Das 10%ige Homogenat wurde mit H₂O im Verhältnis 1:100 (1 mg/ml Frischgewebe) verdünnt. In dieser Konzentration erfolgt keine Farbstoffaufnahme durch das Gewebe. Die Substrate wurden in einer Konzentration von 0,0005 M verwandt. L-Leucyl- β -naphthylamin und dl-Alanyl- β -naphthylamin wurden in Wasser bei 90° C) und Glycyl- β -naphthylamin in Azeton gelöst und in die Pufferlösung übergeführt. Als Puffer wurde Phosphatpuffer 0,05 M (nach Sørensen) pH 7,2 verwandt. Der Standardansatz betrug

5 ml Substratlösung (0,0005 M) gepuffert mit 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,2,

1 ml Enzymlösung (1 mg Frischgewebe/ml), gepuffert mit 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,2.

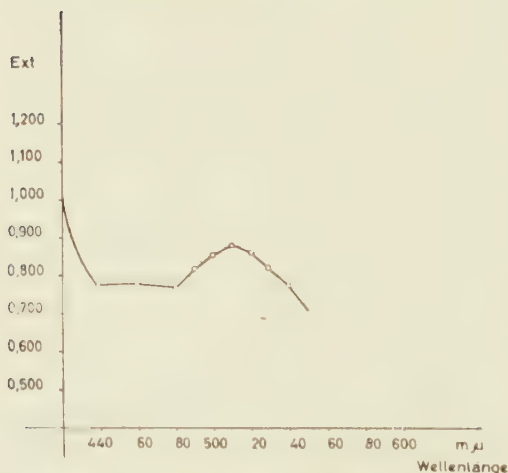


Abb. 1. Kolorimetrische Bestimmung der Amino-peptidase. Absorption des Fermentansatzes nach Zugabe von diazotiertem o-Aminoazotoluol. Ansatz: 1,0 ml Gewebemogenat, 0,1% 0,0005 M dl-Alanyl β -naphthylamin in 5 ml 0,05 M Phosphatpuffer nach Sørensen, pH 7,2 0,9 ml 1 M Azetatpuffer pH 4,6 0,1 ml Tween 20, 0,5 ml 0,5% diazotiertes o-Aminoazotoluol. Inkubationszeit 3 Std. 37°

Die Inkubation erfolgte bei 37° C im Wasserbad. Nach Ende der Inkubation wurde 0,9 ml 1 M Azetatpuffer pH 4,6 mit 0,1 ml Tween 20 (Polyoxyäthylensorbitanmonolaurat als Lösungsvermittler) und 0,5 ml einer frisch bereiteten Lösung von diazotiertem o-Aminoazotoluol (I) in Wasser (0,5%) zugegeben. Bei pH 5 entwickelte sich eine intensive rote Farbe, deren Absorptionsspektrum in Abb. 1 dargestellt ist. Nach 10 Minuten wurde die Extinktion der klaren, rotgefärbten Lösung bei 510 mμ im Beckman - Spektralphotometer ermittelt.

Aus einer Eichkurve kann nach Abzug des Blindwertes die Menge des

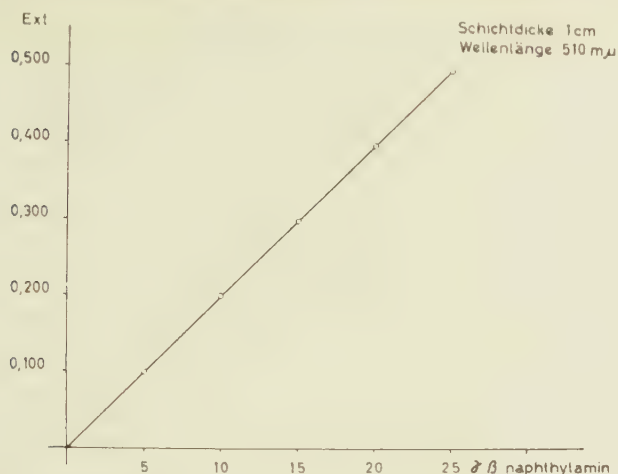


Abb. 2. Kolorimetrische Bestimmung der Aminopeptidase. Eichkurve zur Bestimmung des β -naphthylamin. Zur Aufstellung der Eichkurve: In verschiedenen Ansätzen an Stelle des Gewebehomogenat 1 ml H_2O und an Stelle des dl-Alanyl- β -naphthylamins β -naphthylamin in verschiedenen Konzentrationen. Kolorimetrische Bestimmungsmethode. Dargestellt Mittelwerte aus 3 Messungen

freigesetzten β -Naphthylamin bestimmt werden (siehe Eichkurve, Abbildung 2). Substrat-Leerversuch und Ferment-Leerversuch ergaben in dem untersuchten Zeitraum keine erkennbare β -Naphthylaminabspaltung. Parallel zu jedem Fermentversuch lief ein Enzym-Substrat-Leerversuch, wobei Homogenat und Substrat getrennt inkubiert und nach Versuchsende zusammengegeben wurden.

d) Fehlerberechnung: Die Schwankungsbreite beträgt bei 10 Fermentansätzen von Endometrium 788,57 unter den gleichen Versuchsbedingungen:

Gemessene Ext.	0,523	0,540	0,548	0,550	0,540	0,572	0,530	0,565	0,565	0,542
β -Naphthylamin in γ	22,6	27,0	27,0	27,4	27,0	28,6	26,6	28,0	28,0	27,0
$M =$	27,3									
$s =$	0,2111									
$s_m =$	$\pm 0,067$									

e) Zur Darstellung der Versuchsergebnisse: Bei der kolorimetrischen Aktivitätsbestimmung wird die Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber den synthetischen Substraten ausgedrückt durch

$$K_0 = \frac{\mu g \text{ freigesetztes } \beta\text{-Naphthylamin}}{t}$$

und die spezifische Aktivität nach der Formel

$$C_0 = \frac{K_0}{N}$$

berechnet, wobei K_0 die freigesetzte Menge von β -Naphthylamin in $\mu g/h$ und N der Gesamtstickstoffgehalt in mg pro ml Enzymlösung sind.

f) Histochemische Untersuchungen: Das Prinzip der färberischen Darstellung der Exopeptidasen entspricht dem der kolorimetrischen Aktivitätsbestimmung. Da über den histochemischen Nach-

weis [5, 6] dieser Fermente nur wenige Erfahrungen vorliegen und die bisher verwandte Methode bei unseren Untersuchungen keine zufriedenstellenden Ergebnisse zeigte, wurde zunächst in einer Reihe von Vorversuchen die günstigste Arbeitsmethodik ermittelt.

Substrate: Von den angewandten Substraten Glycyl- β -naphthylamin, dl-Alanyl- β -naphthylamin und l-Leucyl- β -naphthylaminhydrochlorid (Dajak-Laboratories, USA) erwies sich dl-Alanyl- β -naphthylamin am geeignetsten, da die Aufspaltung sehr rasch erfolgte (s. den Vergleich der Spaltungsraten) und die Inkubationszeit infolgedessen kürzer war als bei den anderen Substraten. In der Regel wurden die Substrate in einer Konzentration von 0,1 bis 1,0 mg pro ml verwandt (s. Abhängigkeit der Hydrolyse von der Substratkonzentration S. 1111).

Diazo-Kuppelungsreaktion: Das durch enzymatische Hydrolyse abgespaltene β -Naphthylamin gab mit Diazoniumsalzen eine deutliche Farbreaktion, während Gewebe ohne Fermentaktivität nur die Farbe des Diazoniumsalzes annahm. Die beste Darstellung der Peptidaseaktivität erzielten wir mit der simultanen Kuppelungsreaktion. Bei diesem Verfahren kamen die Schnitte in ein Inkubationsmedium, das sowohl das zu spaltende Substrat als auch das gelöste Diazoniumsalz enthielt. Erfolgte zunächst die Inkubation des Schnittes in der Substratlösung und dann erst die Kuppelung mit dem Diazoniumsalz, konnten keine guten Resultate erzielt werden. Von den bereits bei der kolorimetrischen Fermentbestimmung ausgetesteten Diazoniumsalzen (s. S. 1108) waren Salz I und II und III im Gegensatz zu Salz IV geeignet. Mit Diazoniumsalz V wurde nur eine schwache Farbreaktion erzielt. Bei Kuppelung mit diazotiertem-o-Aminoazotoluol (I) trat bei Peptidaseaktivität eine leuchtende Rotfärbung auf, deren Intensität von der Substratkonzentration, der Dauer der Inkubation und der Fermentaktivität abhängig war. In der Regel wurden die Diazoniumsalze bis zur schwachen Anfärbung des Inkubationsmedium zugesetzt (etwa 0,05%).

Die rote Färbung der Schnitte wurde durch Äthanol, Xylol und Säuren zerstört, während sie im alkalischen Medium (pH 9,2) nach dunkelbraun umschlug. Nach sehr langen Inkubationszeiten (12 bis 24 Stunden) konnte mitunter ein Umschlag der Rotfärbung in einen bläulichen Farbton beobachtet werden. Dieser Farbumschlag konnte jedoch infolge der kurzen Inkubationszeit von 1 bis 2 Stunden unberücksichtigt bleiben. Kontrollschnitte in wässriger Lösung von Diazoniumsalzen blieben stets ungefärbt. Bei allen Azotarbstoffen machte sich eine gewisse Neigung zur Kristallbildung im Gewebe nach einiger Zeit störend bemerkbar.

Histochemische Färbemethode: An einer weiteren Reihe von Versuchen wurde das Verhalten der Fermentaktivität während der Gewebeaufbereitung (Trocknung, Fixierung, Einbettung) studiert. Obwohl Formaldehyd nach A n s o n [3] ein Hemmstoff der Amino-peptidase sein soll, läßt sich nach kurzer Fixierungszeit mit Formol doch noch eine sehr intensive Farbreaktion erzielen. Erst nach 4- bis 5tägiger Fixierung ist keine Fermentaktivität mehr erkennbar.

Auf Grund der angeführten Vorversuche wurde folgende Methode als am brauchbarsten empfunden:

Die nach der Operation entnommenen Gewebestückchen wurden in kaltem (etwa 0° C) 5%igem, neutralem Formalin etwa 6 bis 12 Stunden fixiert, kurz gewässert und mittels Gefriermikrotom geschnitten. Die

20 bis 30 μ dicken Schnitte wurden in 1%igem neutralem eiskühlem Formalin aufgefangen und sofort in das Inkubationsmedium übergeführt. Dieses enthielt das Substrat (0,1 bis 1,0 mg pro ml, etwa 0,0005 bis 0,005 M) in Phosphatpuffer (0,05 M, pH 7,2) und das Diazoniumsalz in einer Konzentration von 0,05%. Die Inkubation erfolgte im Uhrglasschälchen bei Zimmertemperatur. Es wurden in der Regel viele Schnitte in das Medium gebracht und durch Herausnahme einzelner Schnitte in bestimmten Zeitabschnitten die Stärke der sich entwickelnden Farbreaktion untersucht. So konnte der zeitliche Verlauf der Fermentreaktion verfolgt und aus der Geschwindigkeit der Farbentwicklung und der Stärke der Farb-reaktion auf die Orte der stärksten Peptidaseaktivität geschlossen werden. War eine genügende Anfärbung erzielt, wurden die Schnitte kurz gewässert, in Glycerin oder Glyzeringelatine aufgezogen und mikroskopisch untersucht.

3. Untersuchungsergebnisse

A. Kolorimetrische Bestimmung der Amino-peptidase des Endometrium.

Reaktionskinetische Untersuchungen

Einfluß der Substratkonzentration auf die Spaltungsrate: Um festzustellen, welchen Einfluß die Substratkonzentration auf die Hydrolyse durch Endometriumhomogenat zeigt, wurde in verschiedenen Standardansätzen bei gleicher Enzymkonzentration (1 mg Frischgewebe pro ml) die Substratkonzentration von 0,0001 bis 0,01 M variiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 dargestellt. Aus dieser Abbildung geht hervor, daß die Spaltungsrate bei allen Substraten unter den gewählten Versuchsbedingungen bis etwa 0,005 M proportional der Substratkonzentration ist.

pH-Optimum der Substrat-Hydrolyse durch Endometriumhomogenat: Um den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration festzustellen, wurden GN, AN und LN mit Endometriumhomogenat bei verschiedenem pH inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4 dargestellt. Aus dieser Abbildung geht hervor, daß die untersuchten Substrate (GN, AN, LN) durch Endometriumhomogenat optimal zwischen pH 6,6 und 7,2 gespalten werden.

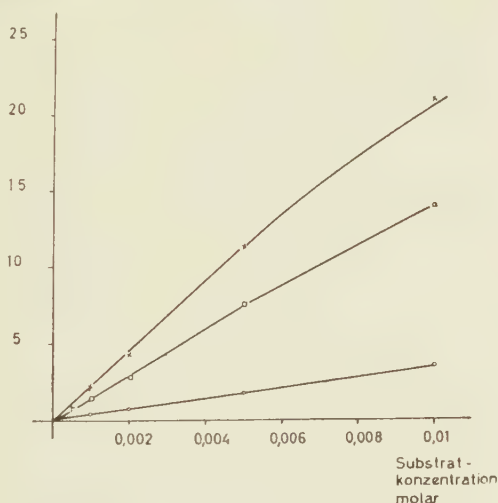


Abb. 3. Glycyl- β -naphthylamin-, dl-Alanyl- β -naphthylamin- und l-Leucyl- β -naphthylamin-Hydrolyse durch Endometrium. Einfluß der Substratkonzentration auf die Spaltungsrate. Ordinate: μ g freigesetztes β -naphthylamin. Abszisse: Substratkonzentration, molar — $\times$ — $\times$ dl-Alanyl- β -naphthylamin — $|$ — l-Leucyl- β -naphthylamin — $\circ$ — $\circ$ Glycyl- β -naphthylamin Standardansatz. Substratkonzentration variiert. Gewebekonzentration 0,1% Homogenat. 0,05 M Phosphatpuffer (n. Sorensen) Inkubation. 15 Min. 37°

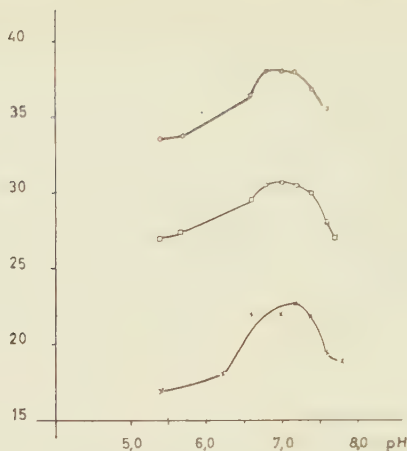


Abb. 4. pH-Optimum der Glycyl- β -naphthylamin-, dl-Alanyl- β -naphthylamin- und l-Leuyl- β -naphthylamin-Hydrolyse (Endometrium 720/57). Ordinate: μg freigesetztes β -naphthylamin — o — o dl-Alanyl- β -naphthylamin — — — l-Leuyl- β -naphthylamin — x — x Glycyl- β -naphthylamin Abszisse: pH Standardansatz. Substratkonzentration 0,0005 M Gewebekonzentration 0,1% Homogenat. 0,15 M Phosphatpuffer (n. S. rensen) pH 7,2 Inkubationszeit 4 h 37°

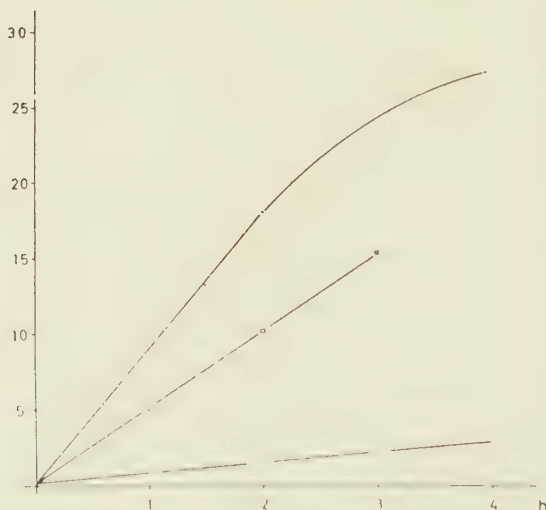


Abb. 5. Zeitlicher Verlauf der Glycyl- β -naphthylamin-, dl-Alanyl- β -naphthylamin- und l-Leucyl- β -naphthylamin-Hydrolyse Endometrium 720/57. Ordinate: μg freigesetztes β -naphthylamin — x — x dl-Alanyl- β -naphthylamin — — — l-Leucyl- β -naphthylamin — o — o Glycyl- β -naphthylamin. Abszisse: Zeit in Stunden. Standardansatz. Substratkonzentration 0,0005 M. 0,05 M Phosphatpuffer (n. S. rensen) pH 7,2. Gewebekonzentration 0,1% Homogenat. Inkubation bei 37°

Zeitlicher Verlauf der Substrat-Hydrolyse durch Endometrium-homogenat: Um den zeitlichen Verlauf der Substrat-Hydrolyse durch Endometrium-homogenat festzustellen, wurden Versuchsansätze unter Standardbedingungen verschieden lange bei 37° C inkubiert. Das Ergebnis ist in Abb. 5 graphisch dargestellt. Aus dieser Abbildung geht hervor, daß die AN-Hydrolyse in der Anfangszeit bis etwa 2 Std. proportional der Zeit verläuft. Die LN-Hydrolyse verläuft bis 3 Stunden, die GN-Hydrolyse bis 4 Stunden linear.

Abhängigkeit der Substrat-Hydrolyse von der Enzymkonzentration: Um festzustellen, ob die Substrat-Hydrolyse von der Enzymkonzentration abhängig ist, wurden verschieden stark verdünnte Endometrium-homogenate bei 37° C inkubiert. Da die Farbentwicklung bei stärkerer Substratspaltung (AN) zu intensiv war, wurden die Versuchsansätze vor der Kolorimetrierung im Verhältnis 1:3 mit H₂O verdünnt. Das Ergebnis ist in Abb. 6 graphisch dargestellt. Aus dieser Abbildung geht hervor, daß die GN-Hydrolyse durch Endo-

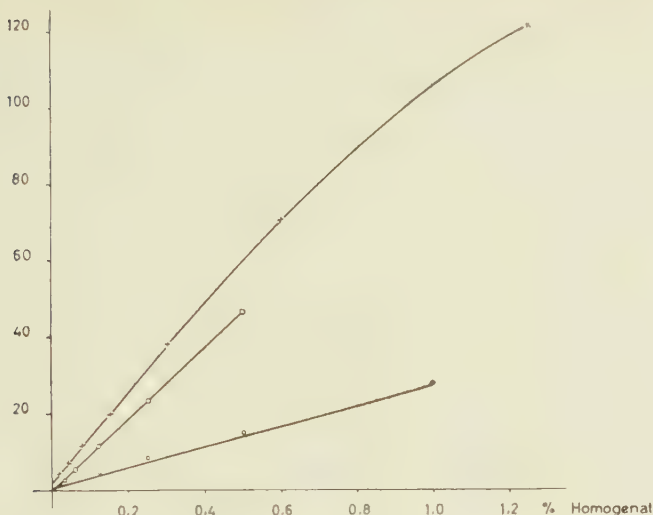


Abb. 6. Abhängigkeit der Glycyl- β -naphthylamin-, dl-Alanyl- β -naphthylamin- und l-Leucyl- β -naphthylamin-Hydrolyse von der Enzymkonzentration. Ordinate: μ g freigesetztes β -naphthylamin./h — $\times$ — $\times$ dl-Alanyl- β -naphthylamin l-Leucyl- β -naphthylamin : — $\square$ — Glycyl- β -naphthylamin Abszisse: Gewebekonzentration % Homogenat. Standardansatz. Substratkonzentration 0,0005 M. Gewebekonzentration variiert. 0,05 M Phosphatpuffer (n. Sørensen) pH 7,2. Inkubation 1 h bei 37°

metriumhomogenat proportional der Konzentration (bis etwa 1 % Homog.) ist. Die Substrathydrolyse ist bei AN und LN bis etwa 0,5% Gewebekonzentration proportional der Enzymkonzentration.

GN

Aktivierung und Hemmung der AN-Hydrolyse

LN

durch Endometrium: Um den Einfluß verschiedener Substanzen auf die Substrat-Hydrolyse festzustellen, wurden Aktivatoren oder Hemmstoffe in der angegebenen Konzentration dem Standardansatz zugegeben. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tab. I zusammengefaßt. Aus der Tab. I ist ersichtlich, daß GN, AN und LN durch Co^{II} in einer Konzentration von 0,001 M gering aktiviert werden, GN und LN werden durch Mn^{II} gering aktiviert. Durch Mg^{II} bleibt die Hydrolyse unbeeinflußt, durch Zugabe von Cu^{II} und Ni^{II} tritt eine Hemmung ein. Die AN-Hydrolyse bleibt durch Na-Zitrat unbeeinflußt.

Amino-peptidase-Aktivität des Endometrium bei verschiedenen Zyklusphasen

Gewählte Versuchsbedingungen:

Standardansatz; 0,005 M Substratkonzentration.

Aktivitätsbestimmungen 6 bis 8 Stunden nach Materialentnahme.

Gewebekonzentration 0,1% = 0,001 g Frischgewebe pro ml Enzymlösung.

0,05 M Phosphatpuffer nach Sørensen, pH 7,2.

Für die Aktivitätsbestimmung errechnet $K_0 = \mu\text{g freigesetztes } \beta\text{-Naphthylamin/h}$ (Mittelwert aus 2 Bestimmungen und spezifische Aktivität $C_0 = \frac{A_0}{m \cdot N/\text{ml}}$ Enzymlösung).

Die abgespaltene Menge des β -naphthylamin in % der im Ansatz vorhandenen Menge = 100% wird außerdem angegeben.

Tabelle I. GN-, AN- und LN-Hydrolyse durch Endometriumhomogenat. Beeinflussung durch Aktivatoren und Hemmstoffe (Standardansatz, Inkubation 37°)

A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L
Vers.-Nr.	Prot.-Nr.	Ges.-N	Zugegebene Substanz	Konz. d. zugegebenen Substanz M	GN		AN		LN	
					ohne Zu-	mit Zu-	ohne Zu-	mit Zu-	ohne Zu-	mit Zu-
					satz	satz	satz	satz	satz	satz
1	687/57	0,0364	CuSO ₄	0,001 M	4,6	3,4	15,8	4,0	10,2	2,6
2	687/57	0,0364	MnSO ₄	0,001 M	4,6	6,0	15,8	15,0	10,2	12,6
3	687/57	0,0364	Co(NO ₃) ₂	0,001 M	4,6	5,4	15,8	18,8	10,2	16,6
4	687/57	0,0364	Co(NO ₃) ₂	0,001 M	—	—	16,0	18,0	—	—
5	687/57	0,0364	NiSO ₄	0,001 M	4,6	2,6	15,8	7,0	10,2	8,0
6	687/57	0,0364	MgSO ₄	0,001 M	4,6	5,2	15,8	15,6	10,2	11,0
7	687/57	0,0364	Na-Zitrat	0,01 M	—	—	15,8	15,6	—	—

Tabelle II. Glycyl- β -naphthylamin (GN)-, dl-Alanyl-L-naphthylamin (AN)- und l-Leucyl- β -naphthylamin (LN)-Hydrolyse durch Endometrium

A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M
Lfd. Nr.	Prot.-Nr.	Ges.-N	K ₀	GN Hy-%	C ₀ · 10	K ₀	AN Hy-%	C ₀ · 10	K ₀	LN Hy-%	C ₀ · 10
Proliferationsphase											
29	788/57	0,0150	2,3	0,642	1,53	13,6	3,80	9,06	9,4	2,626	6,3
30	630/57	0,0140	1,8	0,503	1,23	10,4	2,906	7,43	6,8	1,899	4,7
31	800/57	0,0150	1,7	0,475	1,31	9,6	2,682	7,58	6,4	1,788	4,9
32	866/57	0,0140	1,3	0,363	0,93	8,0	2,237	5,72	5,1	1,425	3,6
Sekretionsphase											
5	733/57	0,0141	2,3	0,642	1,63	13,8	3,855	9,80	9,2	2,570	6,52
19	661/57	0,0150	2,0	0,559	1,33	11,8	3,296	7,87	7,9	2,207	5,3
35	860/57	0,0200	3,0	0,838	1,49	19,0	5,307	9,40	12,2	3,408	6,0

Decidua graviditatis

1	633/57	0,0110	4,7	1,313	4,20	28,0	7,821	25,00	16,0	4,409	14,3
---	--------	--------	-----	-------	------	------	-------	-------	------	-------	------

Hyperplasie

1	687/57	0,0182	1,6	0,447	0,88	10,4	2,906	5,72	7,4	2,067	4,1
---	--------	--------	-----	-------	------	------	-------	------	-----	-------	-----

A = Laufende Nummer, B = Protokollnummer, C = Gesamt-N ml Enzymlösung, D = K₀ = $\mu\text{g freigesetztes } \beta\text{-Naphthylamin pro Stunde}$, Mittelwert aus 2 Bestimmungen bei 60 und 120 Min. im Standardansatz, E = Hy-% = prozentuale Abspaltung des im Versuchsansatz vorhandenen β -naphthylamin pro Stunde, F = C₀ = K₀ durch Gesamt-N in mg/ml Enzymlösung. Bei AN und LN entsprechend.

G: entsprechend wie D

K: entsprechend wie D

J: „ „ F

M: „ „ F

Aus den Untersuchungsergebnissen (Tab. II) geht hervor, daß alle 3 Substrate durch Endometriumhomogenat hydrolysiert werden. AN wird durch Endometrium am schnellsten hydrolysiert, die AN-Spaltung ist unter den gewählten Versuchsbedingungen im Mittel etwa 1,5mal schneller als die LN- und etwa 6mal schneller als die GN-Hydrolyse. Eine größere Untersuchungsreihe mit diesen Substraten ist vorgesehen, um festzustellen, ob sich im Endometrium während des Zyklus Aktivitätsschwankungen ergeben.

B. Histochemischer Nachweis der Aminopeptidasen

Zu unseren Untersuchungen wurden die Substrate Glycyl- β -naphthylamin, dl-Alanyl- β -naphthylamin und l-Leucyl- β -naphthylaminhydrochlorid verwandt. Der histochemische Nachweis erfolgte nach der auf S. 1110 angegebenen Methode. Wie schon betont, können bei diesem Verfahren durch die Geschwindigkeit der Farbentwicklung und der Intensität der Farbreaktion die Orte der höchsten Fermentaktivität im Gewebeverband festgestellt werden. Nur farbige Abbildungen vermögen die Farbreaktion mit ihren Abstufungen richtig wiederzugeben. Bei den Schwarz-Weiß-Aufnahmen erscheint die Rotfärbung an Stellen der Peptidaseaktivität nur dann schwarz, wenn die Anfärbung sehr intensiv ist.

Untersuchungsergebnisse: Bei der histochemischen Darstellung der Exopeptidasen lassen sich deutlich Unterschiede in der Stärke der Aktivität zwischen den verschiedenen Epithelverbänden einerseits und zwischen Epithel und Bindegewebe andererseits feststellen.

Uterus-Epithelgewebe: Das Zylinderepithel im Zervikalkanal und in den Zervixdrüsen zeigt die weitaus stärkste Peptidaseaktivität. Bereits nach kurzer Inkubation entsteht in diesen Drüsenepithelien eine intensive Anfärbung, die etwa der Stärke der Aktivität der Darmschleimhaut entspricht. In Abb. 7 ist die Schwärzung der Drüsenepithelien ein Zeichen für die Intensität der Anfärbung. Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man, daß die Fermentaktivität in der Einzelzelle hauptsächlich im apikalen Plasmaanteil unter der Zelloberfläche lokalisiert ist. Hier ist ein deutlich erkennbarer Farbsaum vorhanden. Die Anfärbung des Sekretes deutet darauf hin, daß die Peptidasen von den Drüsenepithelien abgesondert werden. Die Kerne der Zylinderepithelien bleiben frei. Zwischen dem Zervixdrüsenepithel und dem Epithel

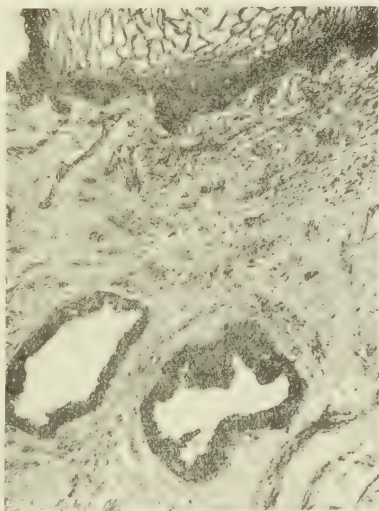


Abb. 7. Aminopeptidase-Aktivität in der Cervixuteri. Substrat dl-Alanyl- β -naphthylamin. Kuppelung mit diazotiertem o-Aminoazotoluol. Schwarz: Aktivitätszone im Stratum germinativum des Plattenepithel, starke Aktivität im Drüsenepithel der Zervixdrüsen. Aktivität im subepithelialen Kapillarnetz.

das den Zervikalkanal auskleidet, scheint kein wesentlicher Unterschied zu bestehen. Im Epithel zystisch erweiterter Drüsen (Ovula Nabothi) ist ebenfalls eine starke Aktivität nachzuweisen.

Das Drüsenepithel des Endometrium gibt im Gegensatz dazu eine wesentlich schwächere Farbreaktion. Innerhalb der Drüsenzelle läßt sich

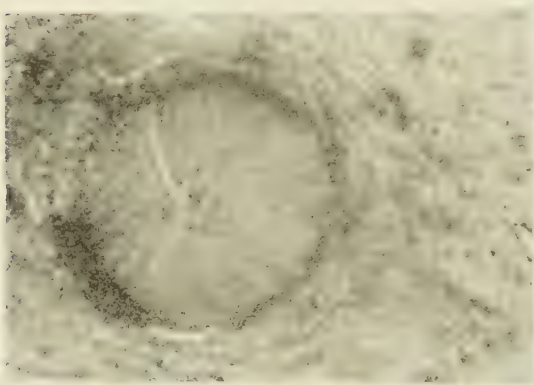


Abb. 8. Epithelzapfen beim sog. Oberflächenkarzinom der Portio uteri. Färbung wie in Abb. 7. Fermentaktivitätszone um den Epithelzapfen. Re. oben Gefäßquerschnitte.

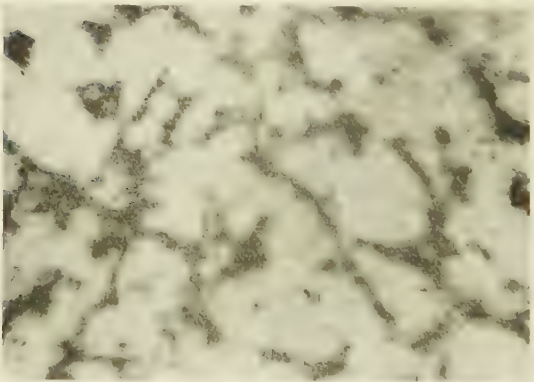


Abb. 9. Ovarialkarzinom vom Typus des Plattenepithelkarzinom. Färbung wie in Abb. 7. Schwarz: fermentaktives Geschwulststroma, Hell: Tumorzellkomplexe.

im basalen Plasmaanteil, subnukleär, eine Aktivitätszone abgrenzen. Diese ist in Abb. 11, die einen Schnitt aus einem Endometrium der Proliferationsphase darstellt, in der oberen Drüse gerade eben erkennbar. Die Epithelkerne bleiben ungefärbt.

In den Drüsen-schläuchen scheinen gewisse Aktivitätsunterschiede zu bestehen. So scheint in der Proliferationsphase die Peptidaseaktivität im basalen Drüsenabschnitt, in der Sekretionsphase die Aktivität im oberen, der Funktionalis zugehörnden Abschnitt zu überwiegen. Bemerkenswert ist, daß sich von der Basalis des Endometrium in die Muskulatur versprengte Drüsen-schläuche vielfach stärker anfärben. Bei Hyperplasien und beim Adenokarzinom war in den Drüsenepithelien keine stärkere Aktivität erkennbar.

Eine Sonderstellung scheint das Oberflächenepithel des Endometrium einzunehmen. In der Proliferationsphase ist zwischen diesem und

dem Drüsenepithel kein wesentlicher Unterschied vorhanden. Bereits in der Sekretionsphase ist die Anfärbung des Oberflächenepithel etwas stärker, und bei der Graviditätsdezipua findet sich in den Oberflächenepithelzellen ein dichter Farbsaum, der auf eine stärkere Peptidaseaktivität in diesen Zellen hindeutet.

Im Plattenepithel der Portio uteri vaginalis läßt sich im Stratum germinativum, also in den basalsten Zellschichten, eine deutliche Akti-

vitätszone abgrenzen. In Abb. 7 erscheint diese Zone schwarz gefärbt. Unterschiede zwischen normalem und metaplastischem Plattenepithel scheinen nicht zu bestehen. Auch beim pathologisch gesteigerten Epithelwachstum, wie im Falle eines sog. Oberflächenkarzinom läßt sich nur in der basalsten Schicht eine stärkere Aktivität nachweisen (Abb. 8).

Uterus-Bindegewebe-Gefäße:

Abgesehen von der starken Peptidaseaktivität in den Zervixdrüsen, zeigt das gefäßführende Bindegewebe eine Fermentaktivität, die im Bereich der Epithel-Bindegewebsgrenze größer als die des Epithel ist. In Abb. 8 sieht man, wie ein Epithelzapfen eines sog. Oberflächenkarzinom ringförmig von einer Aktivitätszone (Schwarzfärbung) umgeben ist. Auch an Drüsen kann man Aktivitätszonen abgrenzen, die hier allerdings schwächer ausgebildet sind. Besonders intensiv ist die Anfärbung des Stroma unter dem Zervixepithel, wenn sich Entzündungsprozesse abspielen. Träger der Aktivität sind in erster Linie die Bindegewebszellen, wobei aber die Kerne frei bleiben. Die Kapillarendothelien geben eine intensive Fermentreaktion. In Abb. 7 ist unter dem Plattenepithel ein Netzwerk kleinster Gefäße erkennbar. In größeren Gefäßen läßt sich in der

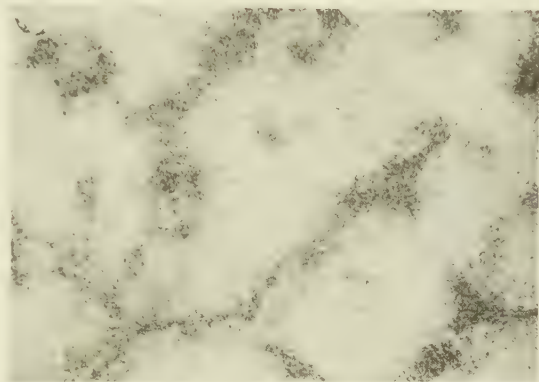


Abb. 10. Wie Abb. 9 bei stärkerer Vergrößerung. Bindegewebszellen des Geschwulststroma gerade eben erkennbar

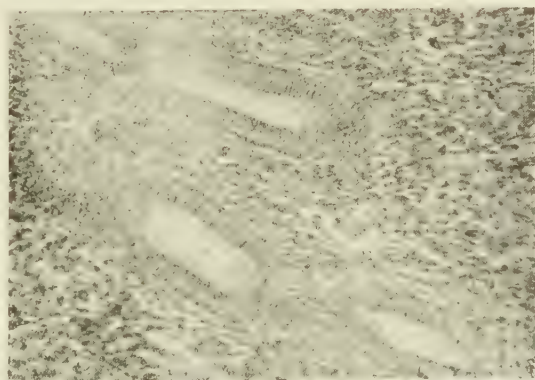


Abb. 11. Aminopeptidase-Aktivität im Endometrium. Färbung wie in Abb. 7. Basale Aktivitätszone in den Zellen der Drüsen erkennbar. Intensive Färbung der Stromazellen

Media eine Fermentaktivität nachweisen, vielfach findet sich eine breite perivaskuläre Aktivitätszone. Auf der Abb. 8 heben sich rechts oberhalb des Epithelzapfens dunkelgefärbte Querschnitte kleiner Gefäße ab. Die unterschiedliche Aktivitätsverteilung zwischen Epithel und Bindegewebe kann bei einem Ovarialkarzinom (Abb. 9) besonders deutlich dargestellt werden. Hier sieht man helle Tumorzellkomplexe, die von schwarzen Stromarändern umgeben werden. Die starke Anfärbbarkeit deutet auf eine hohe Aktivität des Geschwulststroma hin. Bei stärkerer Vergröße-

rung (Abb. 10) kann man die einzelnen Bindegewebszellen als dunkle Punkte eben noch erkennen.

Im Endometrium übertrifft die Farbintensität des Stroma die der Drüsen bei weitem. Nach 1- bis 2stünd. Inkubation erschien das Stroma

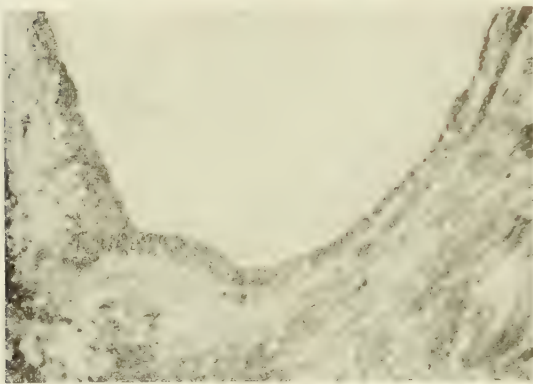


Abb. 12. Aminopeptidase-Aktivität in der Theka folliculi. Substrat: dl-Alanyl-β-naphthylamin, Kuppelung mit diazotiertem 4-Amino-3,6-dimethoxy-4-nitro-azobenzol. Schwarz: Theka folliculi. Granulosasaum gerade noch erkennbar, teilweise abgelöst

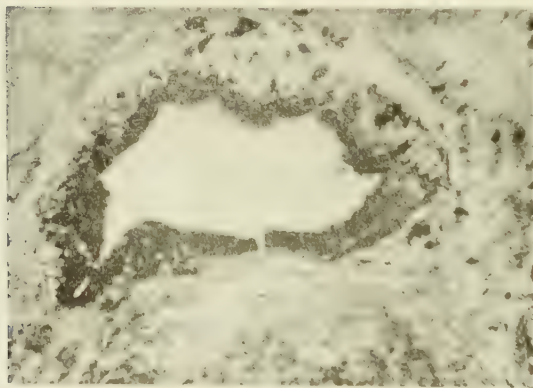


Abb. 13. Aminopeptidase-Aktivität in der Theka eines atretischen Follikel. Färbung wie in Abb. 12

viät auf. Sie sind bereits nach kurzer Inkubationszeit dicht mit Farbgranula angefüllt.

Eileiter: Im Eileiter geben die Epithelzellen eine schwache Peptidase-Farbreaktion. Eine genauere Lokalisierung wurde noch nicht vorgenommen. Das Stroma und die Muskularis sind weniger aktiv.

Ovar: Im Ovar findet sich sowohl beim reifen Bläschenfollikel (Abb. 12) als auch beim atretischen Follikel (Abb. 13) die stärkste Fermentaktivität in der Theka folliculi. Die Granulosa selbst scheint keine

bereits kräftig gefärbt im Gegensatz zu den Schleimhautdrüsen, die zu diesem Zeitpunkt noch ungefärbt waren. Abb. 11 zeigt einen Schnitt aus einem Endometrium. Gut zu erkennen sind die dunklen Stromazellen, die als besonders fermentaktiv anzusprechen sind. Es kommt auf dieser Abbildung allerdings nicht zum Ausdruck, daß das Stroma viel intensiver angefärbt ist als das Drüsenepithel. Im Stroma des Endometrium lassen sich ebenfalls einige Bezirke höherer Aktivität abgrenzen. Wie im Zervixbereich, so sind auch hier die Drüsen von einer Aktivitätszone umgeben. Eine besonders fermentaktive Zone findet sich bei Endometrien der Sekretionsphase in der Umgebung der Spiralarterienbündel. In der Sekretionsphase zeigte die Funktionalis eine stärkere Aktivität als die Basalis. Besonders stark ist die Fermentaktivität in der Decidua graviditatis. Hier weisen die großen, glykogenreichen Dezidua-

wesentliche Fermentaktivität zu besitzen. In Abb. 12 ist sie innerhalb des schwarzen Thekarings als schwacher Schatten gerade eben sichtbar. Das Bindegewebe des Ovar wird nur sehr schwach angefärbt. Beim Corpus luteum ist die Aktivität in den dunkelkernigen, das Luteingewebe umgebenden Thekazellen größer als in den Luteinzellen.

Plazenta: Bei der Plazenta ist ebenfalls die Peptidaseaktivität hauptsächlich an das Gefäßbindegewebe gebunden. In den Plazentazotten findet man im oberflächlichen Synzytium nur eine ganz geringe Aktivität. Im Zottenstroma dagegen treten bereits nach sehr kurzer Inkubationszeit stark fermentaktive, spindelige oder runde Zellelemente auf, deren Kern nur an der Membran gefärbt ist. Die Endothelien der Zottengefäße zeigen eine Fermentaktivität. In Zottenhauptstämmen und im Septum placentae sind die Gefäßwände sehr fermentaktiv. Auch hier zeigen die spindeligen Zellelemente eine intensive Anfärbung. An der Haftstelle der Plazenta sind in der Basalplatte und in den angrenzenden Muskelbündeln starke Aktivitätszonen, die sich bei der Farbreaktion intensivst anfärben. Hier treten Deziduazellen mit intensiver Farbreaktion auf. In der Membrana chorii sind langgestreckte Bindegewebszellen vorhanden, die Fermentaktivität besitzen. Das Amnionepithel zeigt nur eine ganz schwache Aktivität in Form einer feinen Farbgranulierung. In der Nabelschnur ist in den Gefäßwänden eine Fermentaktivität nachweisbar. Die sternförmig verzweigten Bindegewebszellen in der Grundsubstanz der Nabelschnur sind fermentaktiv und werden gut angefärbt. Bei Plazentainfarkten ist gegenüber dem unveränderten Plazentagewebe die Fermentaktivität stark eingeschränkt.

4. Diskussion

Die Ergebnisse der reaktionskinetischen Untersuchungen an Endometrium zum Nachweis der Amino-peptidase mit synthetischen Substraten (GN, AN, LN) stehen in fast völliger Übereinstimmung mit den Angaben, die G o m o r i [10], F o l k und B u r s t o n e [8] und G r e e n und Mitarb. [12] über die Spaltbarkeit dieser Substrate mit Nierenhomogenaten machten. Es konnte auch festgestellt werden, daß GN, AN und LN durch Endopeptidasen, wie Pepsin und Trypsin, nicht gespalten werden. In Übereinstimmung mit G o m o r i [10] und im Gegensatz zu F o l k und B u r s t o n e [8] und G r e e n und Mitarb. [12] wurde gefunden, daß die Hydrolyse der drei Substrate GN, AN und LN durch Endometriumhomogenat durch Co^{II} aktiviert wird.

Als Ergänzung der fermentchemischen Untersuchungen sollte der histochemische Nachweis der Peptidasen direkte Aufschlüsse über die Orte der stärksten Peptidaseaktivität im Gewebe bringen. Entsprechend der Funktion, die den Peptidasen in der Zelle zugeschrieben werden muß (Abbau, Umbau und Aufbau von Eiweißstoffen), hofften wir, damit eine Aussage über die Größe des Eiweißumsatzes einzelner Gewebe- und Zellarten im Gewebeverband machen zu können.

Wenn man die kritischen Äußerungen von P e a r s e, 1954 [22] über die Azo-Farbstoffmethoden in der enzymatischen Histochemie berücksichtigt, bietet die hier angewendete Methode die günstigsten Voraussetzungen, die für eine histochemische Fermentreaktion überhaupt möglich sind. Das Substrat erfüllt

a) Die Spezifitätserfordernisse einer Amino-peptidase;

b) wird es sehr schnell gespalten (Inkubation bei 20° 15 bis 60 Min.);

c) wird durch kurzdauernde kalte neutrale Formalinfixierung die Aktivität nicht wesentlich beeinflusst (s. S. 1110), so daß

d) eine Fermentreaktion an freischwimmenden Gefrierschnitten im Inkubationsmedium möglich ist. Dadurch, daß die zur Kuppelung benutzten Diazoniumsalze die Fermentreaktion nicht hemmen, ist

e) eine Simultan-Kuppelung möglich. Ferner ist

f) der gebildete Azofarbstoff fast unlöslich, so daß nach kurzer Inkubation eine genügend intensive Anfärbung zustande kommt und die Farbintensität einen Rückschluß auf die Fermentaktivität gestattet.

Als wesentliches Ergebnis dieser Arbeit konnte festgestellt werden, daß die Fermentaktivität im Gewebe nicht überall gleich ist, sondern daß sich Gewebe- und Zellarten mit höherer Peptidaseaktivität einerseits und im gleichen Gewebe Zonen mit höherer Aktivität andererseits abgrenzen lassen.

Eine sehr hohe Peptidaseaktivität konnte in den Zervixdrüsen und im Epithel des Zervikalkanals nachgewiesen werden.

Aus den autoradiographischen Untersuchungen über den Einbau von Thioamino-säuren von Niklas und Oehlert [20] geht hervor, daß eiweißsezernierende Zellen stets einen großen Eiweißumsatz haben. Der Gesamteiweißgehalt des Zervikalschleimes beträgt nach Schroeder u. a. [26] etwa 1,5%. Die Menge des in 24 Stunden abgesonderten Sekretes wird mit 0,5 bis 0,7 ml [26] und 1,0 ml [9] angegeben, dabei wurden aber zyklische Schwankungen nicht berücksichtigt. Die histochemisch nachweisbare hohe Peptidaseaktivität in den Drüsenepithelien der Cervix uteri kann als Ausdruck eines hohen Eiweißstoffwechsels gedeutet werden. Sehr viel geringer war dagegen die Peptidaseaktivität in den Drüsen des Endometrium, von denen wir wissen, daß sie nur zu gewissen Zeiten — und dann auch nur in geringerem Maße — Sekret produzieren. In der Proliferation scheint die Aktivität im basalen Drüsenabschnitt, in der Sekretion dagegen im oberen Anteil der Drüsen-schlauche zu überwiegen. Diese Beobachtung steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Tatsache, daß nur im Bereich der Funktionalis eine zyklische Umwandlung der Drüsen erfolgt. Eine höhere Peptidaseaktivität (etwa der Fermentaktivität der Zervixdrüsen entsprechend) war während der Schwangerschaft im Oberflächenepithel des Cavum uteri vorhanden. Eine Aktivitätszunahme machte sich in diesem Epithel bereits während der Sekretionsphase bemerkbar. Das deutet darauf hin, daß dieses Epithel eine Sonderstellung einnimmt. Diese scheint auch aus dem hohen Ribonukleinsäuregehalt der Oberflächenepithelien im Gegensatz zu den Drüsenepithelien während der Sekretionsphase [4] hervorzugehen.

In anderen Geweben kann man vor allem eine stärkere Peptidaseaktivität dort feststellen, wo theoretisch ein großer Eiweißumsatz zu erwarten sein muß. Nach den Vorstellungen von Caspersson, 1950 [7] soll die Größe der Eiweißsynthese einer Zelle ihrem Gehalt an Ribonukleinsäure annähernd proportional sein. Die autoradiographischen Untersuchungen von Niklas und Oehler [20] über die Größe des Eiweißstoffwechsels einzelner Gewebe mit markierten S^{35} -Thioamino-säuren haben diese Vorstellungen weitgehend bestätigt.

Im Plattenepithel der Portio ließ sich in der Keimschicht eine Zone stärkerer Peptidaseaktivität abgrenzen. Nach zahlreichen Untersuchungen besitzen die Zellen dieser Schicht einen hohen Ribonukleinsäure-

gehalt [31]. Histochemisch ließ sich in dieser Zone eine Fermentaktivität der Phosphatase, Phosphoamidase und Bernsteinsäure-Dehydrase feststellen. Die Peptidaseaktivität in der Basalschicht des Plattenepithel weist auf die besondere Bedeutung dieser Zone für den Eiweißstoffwechsel des Plattenepithel hin.

Im Bindegewebe ließ sich vor allem an der Epithel-Bindegewebsgrenze eine höhere Peptidaseaktivität darstellen. Die Aktivitätszonen an der Plattenepithel- und Drüsenepithel-Bindegewebsgrenze zeigen, daß hier ein besonders lebhafter Eiweißumsatz stattfinden muß, der mit der Größe des Stoffaustausches zwischen dem reich kapillarisierten Bindegewebe und dem nicht vaskularisierten Epithelgewebe in Verbindung gebracht werden kann. Die Aktivitätszonen unter dem Platten- und Zylinderepithel der Portio erschienen besonders stark ausgeprägt, wenn gleichzeitig unter dem Epithel eine entzündliche Infiltration vorhanden war. Besonders eindrucksvoll konnte der Aktivitätsunterschied zwischen Epithel und gefäßführendem Stroma an einem Ovarialkarzinom demonstriert werden. Ob die Höhe der Peptidaseaktivität im Geschwulststroma von Besonderheiten des Tumorstoffwechsels abhängt, läßt sich vorläufig nicht entscheiden.

Die hohe Peptidaseaktivität in den Gefäßendothelien und Gefäßwänden stimmt weitgehend mit dem Verhalten anderer Fermente, wie der Phosphatase (Übersicht siehe bei R u n g e und E b n e r [25]) und der Nukleotidase [29] überein.

Auch die Stärke der Peptidaseaktivität im Endometriumstroma weist auf die Bedeutung hin, die das Bindegewebe im Stoffaustausch zwischen Epithel und Bindegewebe besitzt. Die Aktivität des Stroma übertraf im Endometrium die der Drüsen. Dem Drüsenbild entspricht jeweils ein ganz bestimmter Zustand des Stroma und seiner Zellen. Beide Anteile der Schleimhaut unterliegen während des ganzen Zyklus einer gesetzmäßigen hormonabhängigen Umgestaltung, die für jeden Phasenabschnitt als typisch zu gelten hat (Konkordanz von Drüsen und Stroma, M a s s h o f f [15]). Histochemisch bestand kein Anhaltspunkt dafür, daß die Basalis einem bestimmten Hormoneinfluß unterliegt. Die Eiweißsynthese bleibt auch in ihren Zellen nach den Untersuchungen über den Ribonukleinsäuregehalt in allen Stadien praktisch gleich. Dagegen schien die Peptidaseaktivität in der Funktionalis während des Zyklus zuzunehmen. Die pseudodezidualen Zellen in der Sekretionsphase gaben eine besonders intensive Anfärbung. Das steht in guter Übereinstimmung mit den Untersuchungen von B r e m e r und Mitarbeitern [4], nach denen der Ribonukleinsäuregehalt in den Deziduazellen zunimmt.

Im Eierstock konnte eine stärkere Peptidaseaktivität vor allem in der Theka folliculi und eine schwächere in den Theka-Luteinzellen nachgewiesen werden. Gegenüber diesen beiden Zonen war die Fermentaktivität im übrigen Teil des Eierstockes sehr viel geringer. Insbesondere war die Aktivität in den Granulosa- und Luteinzellen viel schwächer ausgeprägt.

Diese Befunde zeigen die besondere Stoffwechselaktivität der Theka, die mit vielen histochemischen und ferment-histochemischen Beobachtungen übereinstimmt, wie Anhäufung sudanophiler und doppelbrechender Substanzen, ungesättigter polyzyklischer Komponenten [18] und Phosphataseaktivität in dieser Zone. Daß die Fermentaktivität nicht

nur im reifenden Follikel vorhanden ist, sondern auch noch bei atretischen Follikeln weiterbesteht, geht aus den beiden Abbildungen deutlich hervor. Es liegt nahe, die Fermentaktivität mit der Produktion der Sexualhormone, die heutzutage in der Theka vermutet wird (Übersicht siehe bei Ober [21], in Verbindung zu bringen.

Die gleiche Bedeutung scheint dem Bindegewebs- und Gefäßsystem in der Plazenta zuzukommen, wie aus der Aktivität der Zellen des Zottenstroma und der Gefäßendothelien in den Resorptionszotten und in den Gefäßwänden der Stammzotten hervorgeht. Viele Parallelen ergeben sich mit dem Verhalten der Nukleotidase-Aktivität [28]. Es wird eine weitere Aufgabe sein, zu prüfen, ob sich und wie sich die Peptidaseaktivität in der Plazenta mit fortschreitendem Wachstum ändert.

Nach den Untersuchungen von Niklas und Oehler [20] ist der Eiweißumsatz in der quergestreiften Muskulatur des Körpers niedrig. Damit übereinstimmend ließ sich in der Uterusmuskulatur nur eine sehr geringe Peptidaseaktivität nachweisen.

Bei allen Zellen war die Farbreaktion nur im Zellplasma zu beobachten, die Kerne blieben ungefärbt, mitunter schien der Nukleolus eine stärkere Farbreaktion zu geben. Diese Befunde würden in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Weiss [30], Maver und Greco [16, 17] dafür sprechen, daß die Peptidaseaktivität hauptsächlich im Plasma lokalisiert ist.

Die histochemische Darstellung der Peptidaseaktivität vermittelt ein gutes Bild über Größe des Eiweißumsatzes von Gewebe- und Zellarten. Die fermentchemischen Untersuchungen an Organen, Gewebeverbänden finden damit eine Ergänzung.

Zusammenfassung

1. Von den chromogenen Substraten zum Nachweis einer Amino-peptidaseaktivität werden Glycyl- β -naphthylamin, dl-Alanyl- β -naphthylamin und l-leucyl- β -naphthylaminhydrochlorid durch Endometriumhomogenat hydrolysiert. Die Spaltung der Substrate ist der Substratkonzentration bis 0,005 M, der Zeit bis 2 bis 4 Stunden und der Enzymkonzentration bis 0,5% Gewebekomogenat proportional. Unter den gewählten Versuchsbedingungen erfolgt die Substratspaltung optimal zwischen pH 6,6 und 7,2. CoII aktiviert in geringem Maße.

2. Histochemisch wurde erstmals die Amino-peptidase an Geweben der weiblichen Genitalorgane dargestellt. Es konnte gezeigt werden, daß mit dieser Darstellungsmethode direkte Einblicke in den Eiweißstoffwechsel der einzelnen Gewebe und Zellarten zu bekommen sind und daß vielfach Übereinstimmung mit autoradiographischen Untersuchungen über den Einbau von markierten Thioamino-säuren und mit den Vorstellungen von Caspersson über die Rolle der Nukleinsäuren bei der Eiweißsynthese besteht. Neben vielen Einzelbefunden konnte vor allem die Bedeutung des Bindegewebes im Stoffaustausch an den Bindegewebeepithelgrenzen demonstriert werden.

Schrifttum

1. Abderhalden, E., und M. Kempe, Synthese von Polypeptiden. XX. Derivate des Tryptophans. Ber. Dtsch. chem. Ges. Jg. XL, S. 2737, 1907. — 2. Abderhalden, E., Z. physiol. Chem. **66** (1910), 137. — 3. Anson, M. L., Science **81** (1935), 467. Zit. nach Nord-Weidenhagen, Hdbch. Enzymol. 1940. — 4. Bremer, E., K. G. Ober und J. Zauder, Arch. Gynäk. **181** (1951), 96. — 5. Burstone, M. S., J. Nat. Cancer Inst. Wash. 16/5 (1956), 1149. — 6. Burstone, M. S., und J. E. Folk, J. Histochem. Cytochem. **4** 3 (1956), 217. — 7. Caspersson, T., Cell Growth and Cell Function. A Cytochemical Study. New York 1950. — 8. Folk, J. E., und M. S. Burstone, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., N. Y., **89** (1955), 473. — 9. Goecke, H., R. Billich und N. Schümmelfelder, Arch. Gynäk. **182** (1952), 251. — 10. Gomori, G., Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **85** (1954), 570. — 11. Gomori, G., Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **87** (1954), 559. — 12. Green, M. N., K.-Ch. Tsou, R. Bressler und A. M. Selig-

man, Arch. Biochem. Biophys. **57** (1955), 458. — 13. Linderstrom-Lang, K., Proteins and Enzymes. Lane Medical Lectures, Stanford University Press, California 1952. — 14. Marshall, J. M. jr., Exper. Cell. Res. **6** (1954), 240. — 15. Masshoff, W., Die physiologische Regeneration. Hdbch. allg. Path. VI, I, 441. 1955. — 16. Maver, M. E., und A. E. Greco, J. Nat. Cancer Inst. **12** (1951), 37. — 17. Maver, M. E., A. E. Greco, E. Lovtrup und A. J. Dalton, J. Nat. Cancer Inst. **13** (1952), 687. — 18. McKay, D. G., und D. Robinson, Endocrinology **41** (1947), 378. — 19. Neubauer, O., und H. Fischer, Arch. klin. Med. **97** (1909), 499. — 20. Niklas, A., und W. Oehlert, Beitr. path. Anat., Jena, **116** (1956), 92. — 21. Ober, K. G., Die Behandlung der unzulänglichen Keimdrüsenfunktion. In Seitz, L. und A. Amreich, Biologie und Pathologie des Weibes, Bd. II/II, S. 725, 1952. — 22. Pearse, A. G. E., Azo dye Methods in Enzym Histochemistry. Internat. Review of Cytology. S. 329, New York 1954. — 23. Ravin, H. A., und A. M. Seligman, J. biol. Chem., Baltimore, **190** (1951), 391. — 24. Ravin, H. A., P. Bernstein und A. M. Seligman, J. biol. Chem., Baltimore, **203** (1954), 1. — 25. Runge, H., und H. Ebner, Die Bedeutung der Histochemie für die Gynäkologie, in T. Antoine, Klinische Fortschritte der Gynäkologie, S. 141. 1954. — 26. Schroeder, R., R. Hinrichs und R. Kessler, Arch. Gynäk. **128** (1926), 94. — 27. Seligman, A. M., und G. Wolf, J. Amer. Chem. Soc. **73** (1951), 2086. — 28. Thomsen, K., und R. Panka, Arch. Gynäk. **188** (1950), 95. — 29. Wachstein, M., und W. Meisel, Science **3** (1952), 652. — 30. Weiß, B., J. biol. Chem. **205** (1953), 193. — 31. Wislocki, G. B., Bunting, H., und E. W. Dempsey, in: Menstruation and its Disorders, Springfield 1950.

ZENTRALBLATT FÜR GYNÄKOLOGIE

Erscheint wöchentlich, jährlich 52 Hefte. Bezugspreis vierteljährlich DM 17.—

B. G. Teubner, Leipzig C 1, Querstr. 17 (III/18/154) — ZLN 5053

